

**\* NOTICES \***

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

**CLAIMS**

[Claim(s)]

[Claim 1] It is the approach of separating a component from plasma (I). It is the above-mentioned process which comes to contain the plasma with which it is the process which divides plasma into the 1st and 2nd components, and the 1st component contains the component for which the 2nd component has larger molecular weight than albumin coming [ the pool of albumin/alpha 1-antitrypsin ] by moving the 1st component through the 1st electrophoresis demarcation membrane under the effect of potential.; (II) Process which generates the immunoglobulin concentrate containing the immunoglobulin which does not contain substantially the component which processes the 2nd component under the existence of the 2nd electrophoresis demarcation membrane under the effect of potential, and has molecular weight smaller than an immunoglobulin; (III) Process; which removes the component which processes an immunoglobulin concentrate under the existence of the 3rd electrophoresis demarcation membrane under the effect of potential, and has larger molecular weight than an immunoglobulin, and (IV) The approach of coming to contain the process which separates albumin and alpha 1-antitrypsin from the pool of albumin/alpha 1-antitrypsin by passing the 4th electrophoresis demarcation membrane and moving alpha 1-antitrypsin under the effect of potential.

[Claim 2] Process I (a) It is the above-mentioned step separated with the limit film which it is the step which puts in plasma in the style of the 1st solvent, and the 1st solvent style reaches by the 1st electrophoresis demarcation membrane which has a molecular weight cut-off smaller than the molecular weight of albumin from the 2nd solvent style, and has a molecular weight cut-off smaller than this 1st electrophoresis demarcation membrane.;

(b) Step which chooses the 1st solvent appropriation buffer which has pH higher than pI of albumin;

(c) Although potential is applied between [ of two ] solvent styles and the albumin to the inside of the 2nd solvent style and migration of alpha 1-antitrypsin are made to cause through the 1st electrophoresis film The biomolecule which has larger molecular weight than albumin and alpha 1-antitrypsin is substantially held in the style of the 1st solvent. Or the biomolecule in the plasma which prevents passing the 1st electrophoresis film substantially and has molecular weight smaller than albumin and alpha 1-antitrypsin here if it advances into the 1st electrophoresis film is a step moved to trash deposition through the 1st demarcation membrane and the limit film.;

(d) Although stop or reverse potential periodically depending on the case, migration of the biomolecule which has larger molecular weight than the albumin and alpha 1-antitrypsin which advanced into the 1st electrophoresis film is made to cause and back-migration is carried out into the 1st solvent style Step; and (e) into which all of the albumin or alpha 1-antitrypsin which entered here in the style of the 2nd solvent are not made to re-advance substantially in the style of the 1st solvent The desired albumin and the alpha 1-antitrypsin of an amount as a pool of albumin/alpha 1-antitrypsin The approach according to claim 1 of coming to contain the step which maintains a step (d) depending on a step (c) and the case until it will remove the biomolecule which collects and has molecular weight smaller than albumin and alpha 1-antitrypsin from the 1st solvent style, and produces processing plasma.

[Claim 3] Process II (f) It is the above-mentioned step which is a step which puts in processing plasma 3rd in the style of a solvent, and is separated from the 4th solvent style by the 2nd electrophoresis demarcation membrane which has the molecular weight cut-off with the 3rd solvent style smaller than the molecular weight of an immunoglobulin.;

(g) Step which chooses the 3rd solvent appropriation buffer which has pH higher than neutrality;

(h) Although migration of the biomolecule which applies potential between the 3rd solvent style and the 4th solvent style, and has molecular weight smaller than the immunoglobulin in the processing plasma to the inside of the 4th solvent style through the 2nd electrophoresis demarcation membrane is made to cause Step which will prevent passing the 2nd electrophoresis demarcation membrane substantially if the biomolecule which has larger molecular weight than an immunoglobulin and an immunoglobulin is substantially held in the style of the 3rd solvent or it advances into the 2nd electrophoresis demarcation membrane;

(i) Step into which all of biomolecule that have molecular weight smaller than the immunoglobulin which entered here in the style of the 4th solvent although stop or reverse potential periodically depending on the case, migration of other biomolecules which have larger molecular weight than the immunoglobulin and immunoglobulin which advanced into the 2nd electrophoresis demarcation membrane is made to cause and back-migration is carried out into the 3rd solvent style are not made to re-advance substantially in the style of the 3rd solvent;

(j) step; which maintains (i) depending on a step (h) and the case until it will remove the amount of the request of biomolecule which has molecular weight smaller than an immunoglobulin from the 3rd upstream, and produces an immunoglobulin concentrate, and (k) The approach according to claim 1 of coming to contain the step which removes a top Norio object molecule from the 4th solvent style.

[Claim 4] Process III (l) Step which replaces the 2nd electrophoresis demarcation membrane with the 3rd electrophoresis demarcation membrane which has a larger molecular weight cut-off than the molecular weight of an immunoglobulin;

(m) Step which chooses the buffer for immunoglobulin concentrates which has pH below neutrality;

(n) Although migration of the immunoglobulin which applies potential between the immunoglobulin concentrate of the 3rd solvent style and the fresh 4th solvent style, and is contained in the immunoglobulin concentrate in the 3rd solvent style to the inside of the fresh 4th solvent style through the 3rd electrophoresis demarcation membrane is made to cause Step which will prevent passing the 3rd electrophoresis demarcation membrane substantially if the biomolecule which has bigger molecular weight than an immunoglobulin is substantially held in the style of the 3rd solvent or it advances into the 3rd electrophoresis demarcation membrane;

(o) Although stop or reverse potential periodically depending on the case, migration of the biomolecule which has larger molecular weight than the immunoglobulin which advanced into the 3rd electrophoresis demarcation membrane is made to cause and back-migration is carried out into the 3rd solvent style [ finishing / processing ] Step; and (p) which are not made to re-advance substantially in the style of [ finishing / processing of all of an immunoglobulin that entered in the style of / fresh here / the 4th solvent ] the 3rd solvent Until it will move the amount of a desired immunoglobulin to the 4th fresh lower stream of a river The approach according to claim 1 of coming to contain the step which maintains (o) depending on a step (n) and the case.

[Claim 5] Process IV (q) It is the above-mentioned step which is a step which puts in albumin / alpha 1-antitrypsin concentrate in the style of the 5th solvent, and is separated from the 6th solvent style by the 4th electrophoresis demarcation membrane which has the molecular weight cut-off with the 5th solvent style smaller than the molecular weight of albumin.;

(r) Step which chooses the 5th solvent appropriation buffer which has pH higher than neutrality;

(s) Step which will prevent passing the 4th electrophoresis demarcation membrane substantially if albumin is substantially held in the style of the 5th solvent or it advances into the 4th electrophoresis demarcation membrane, although potential is applied between the 5th solvent style and the 6th solvent style and migration of the alpha 1-antitrypsin to the inside of the 6th solvent style is made to cause through the 4th electrophoresis demarcation membrane;

(t) Although stop or reverse potential periodically depending on the case, migration of the albumin which advanced into the 4th electrophoresis demarcation membrane is made to cause and back-migration is carried out into the 5th solvent style Step; and (u) into which all of the alpha 1-antitrypsin which entered here in the style of the 6th solvent are not made to re-advance substantially in the style of the 5th solvent Until it will leave the amount of desired albumin in the style of the 5th solvent and will remove the amount of desired alpha 1-antitrypsin to the 6th solvent style The approach according to claim 1 of coming to contain the step which maintains (t) depending on a step (s) and the case.

[Claim 6] The approach according to claim 1, 2, or 5 by which Process IV is carried out after Process I.

[Claim 7] The approach according to claim 1 to 6 of being the human plasma sample which plasma pooled.

[Claim 8] The approach according to claim 2 the 1st electrophoresis demarcation membrane of a step (a) has the molecular weight cut-off of about 75 kDa, and the limit film has the molecular weight cut-off of about 50 kDa.

[Claim 9] The approach according to claim 2 pH of the buffer of a step (b) is 9.

[Claim 10] The approach according to claim 9 a buffer is a Tris boric-acid buffer.

[Claim 11] The approach according to claim 3 the 2nd electrophoresis demarcation membrane of a step (f) has the molecular weight cut-off of 200 kDa.

[Claim 12] The approach according to claim 3 pH of the 3rd solvent style of a step (g) is 9.

[Claim 13] The approach according to claim 4 the 3rd electrophoresis demarcation membrane of a step (i) has the molecular weight cut-off of 500 kDa.

[Claim 14] The approach according to claim 4 that pH of the buffer of the immunoglobulin concentrate of a step (m) is lower than 5.

[Claim 15] The approach according to claim 14 pH of a buffer is 4.6.

[Claim 16] The approach according to claim 5 the 4th electrophoresis demarcation membrane of a step (q) has the molecular weight cut-off of about 50 kDa.

[Claim 17] The approach according to claim 5 pH of the buffer of the 5th solvent style of a step (r) is 8.0.

[Claim 18] The approach according to claim 17 a buffer is a Tris boric-acid buffer.

[Claim 19] The approach according to claim 2 of applying the potential of 250 volts at a step (c).

[Claim 20] The approach according to claim 3 of applying the potential of 250 volts at a step (h).

[Claim 21] The approach according to claim 4 of applying the potential of 250 volts at a step (n).

[Claim 22] The approach according to claim 5 of applying the potential of 250 volts at a step (s).

[Claim 23] The approach according to claim 1 to 22 an immunoglobulin is immunoglobulin G (IgG).

[Claim 24] The approach according to claim 1 to 23 the yield of the albumin from plasma, an immunoglobulin, and alpha 1-antitrypsin is at least 70%, and purity is at least 90%.

[Claim 25] The approach according to claim 1 to 24 by which albumin, an immunoglobulin, and alpha 1-antitrypsin are separated from plasma within one day.

[Claim 26] The approach according to claim 25 by which albumin, an immunoglobulin, and alpha 1-antitrypsin are separated from plasma within 12 hours.

[Claim 27] The approach according to claim 25 by which albumin, an immunoglobulin, and alpha 1-antitrypsin are separated from plasma within 6 hours.

[Claim 28] Use of the Gradiflow (trademark) technique in the purification of albumin, an immunoglobulin, and alpha 1-antitrypsin and/or separation from the pooled plasma sample.

[Claim 29] Use according to claim 28 whose immunoglobulin is immunoglobulin G (IgG).

[Claim 30] The isolation albumin refined by the approach according to claim 1 to 27, an immunoglobulin, and alpha 1-antitrypsin.

[Claim 31] The isolated immunoglobulin according to claim 30 which comes to contain immunoglobulin G (IgG).

[Claim 32] Medical and use in veterinary medicine-application of albumin according to claim 30, an immunoglobulin, and alpha 1-antitrypsin.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

Technical field This invention relates to separation of the biomolecule from plasma, especially human plasma.

[0002]

Background technique Human plasma contains about 3000 sorts of protein which has the possibility of various functions and a therapy application. Strict regulation of plasma available to blood fractionation means that supplies of important remedies, such as IgG, are reduced severely. The blood fractionation approach of being very low yield and requiring three - five days with this is the international insufficient cause of main plasma fractions.

[0003]

A Gradiflow (trademark) technique this invention persons by whenever [ high-speed isolation time amount, high recovery, and superresolution ] It found out that it was the effective purification technique replaced with the conventional Cohn precipitation and a column chromatography (). [ Horvath SZ, Corthals GL, Wrigley CW and Margolis J., ] [ Multifunctional ] apparatus for electrokinetic processing of proteins (multifunctional equipment for electric dynamical processing of protein), and Electrophoresis 1994; 15:968.

[0004]

Albumin and IgG have considerable commercial value for both very importantly therefore in medicine. The world market values annual by the albumin independent are estimated to be the 1,500 million U.S. dollars (SG Cowen, Perspectives Blood Transfusion Industry (transfusion industrial view), October 1998, pp54). The conventional purification protocol requires time and effort, and is expensive because of low yield and the long processing time (Allen PC, Hill EA, Stokes AM in Plasma Proteins Analytical and Preparative Techniques (plasma protein analytical skill and preparation technique), Blackwell Scientific Publications, London 1977, pp.182-189).

[0005]

Albumin is a protein component (50 mg/mL) which exists most in human plasma, and achieves the function to maintain total blood volume and colloidal osmotic pressure (oncotic pressure). Albumin adjusts transportation of protein, a fatty acid, hormone, and a drug again (Allen PC, Hill EA, Stokes AM in Plasma Proteins Analytical and Preparative Techniques, Blackwell Scientific Publications, London 1977, pp.182-189). The blood volume permutation under surgical operation, a shock, a critical burn, the therapy of other medical emergency, and stabilization of other drugs are mentioned to a clinical application.

[0006]

Albumin has the molecular weight of 67kDa(s), and has the about 4.9 isoelectric point (pI). This protein has a single subunit and the configuration is spherical (Andersson LO, in Blomback B, Lars HA (piece), Plasma Proteins (plasma protein), A Wiley Interscience Publication New York, 1979, and pp 43-45). The conventional purification scheme uses Cohn ethanol settling, and only 50% of recovery is acquired.

[0007]

the immunoglobulin in which immunoglobulin G (IgG) exists most -- it is -- the component of the total immunoglobulin in a Homo sapiens blood serum -- it almost hits to 70%. The IgG concentration in normal plasma is about 10 mg/mL (Bennich H in Blomback B, Lars HA (piece), Plasma Proteins (plasma protein), A Wiley Interscience Publication New York, 1979, and pp 122). IgG plays a role essential to an immune response, and it is based on a snake and the spider, bites, and has clinical applications, such as a therapy of a blemish and neuropathy, and IgG is widely used for analysis or a diagnostic kit.

[0008]

A gamma globulin has the molecular weight of about 150 kDa(s), and consists of 4 chains, the two are a light chain, and two are a heavy chain (Bennich H in Blomback B, Lars HA (piece), Plasma Proteins, A Wiley Interscience Publication New York, 1979, and pp 122). An immunoglobulin is traditionally isolated using an affinity chromatography instead of Cohn ethanol precipitation (Allen PC, Hill EA, Stokes AM in Plasma Proteins Analytical and Preparative Techniques, Blackwell Scientific Publications, London 1977, pp.178).

[0009]

Alpha 1-antitrypsin is the acid glycoprotein of 54 kDa which has the isoelectric point of 4.8, and is used for the therapy of hereditary emphysema (Allen PC, Hill EA, Stokes AM in Plasma Proteins Analytical and Preparative Techniques, Blackwell Scientific Publications, London 1977, pp.210-211). The conventional purification scheme uses the combination of Cohn fractionation and a column chromatography, and the main difficulties are to remove albumin from an alpha 1-antitrypsin preparation object (Allen PC, Hill EA, Stokes AM in Plasma Proteins Analytical and Preparative Techniques, Blackwell Scientific Publications, London 1977, pp.212). The present production scheme offers about 30% of yield, and, as for the many, albumin is intermingled. this invention persons applied Gradiflow™ and offered the alternative technology which produces the alpha 1-antitrypsin of a high grade with yield higher than 70%. This approach also illustrates the use at the time of isolating the protease inhibitor of a Gradiflow (trademark) technique again.

[0010]

Gradiflow (trademark) technique A Gradiflow (trademark) technique uses size and the molecule property of a charge (Electrophoresis 1994:15: Horvath SZ, Corthals GL, Wrigley CW and Margolis J. Multifunctional apparatus for electrokinetic processing of proteins, 968), and isolates protein using two-dimensional-electrophoresis separation and preparative chromatography processing. Protein is more expensive than the isoelectric point (pI), or exists as a low electric charge molecule. The net charge of a giant molecule is controlled by selection of Buffer pH in Gradiflow (trademark). In electric field, a charge and/or a size difference separate protein. Two or more examples of a Gradiflow (trademark) technique are looked at by U.S. Pat. No. 5039386 and No. 5650055, and these United States patents are included in this specification by reference.

[0011]

this invention persons found out that a Gradiflow (trademark) technique was applied and the biomolecule component from which a large number differ from plasma could be refined. this invention persons are albumin and IgG from the plasma of the single volume. It reaches. The approach of carrying out high-speed isolation of the alpha 1-antitrypsin at high yield and low costs in the process of four processes (phase) was thought out.

[0012]

Indication of invention In a general mode, this invention relates to the successive separation (sequential separation) of the biomolecule of a large number which exist in a plasma sample characterized by using the four main separation processes or processes.

[0013]

It is the approach this invention separates a component from plasma in the 1st mode. The following process : (I) It is the process which divides plasma into the 1st and 2nd components by moving the 1st component through the 1st electrophoresis demarcation membrane under the effect of potential. For the

2nd component, the 1st component is the above-mentioned process which comes to contain the plasma containing the component which has larger molecular weight than albumin coming [ the pool of albumin/alpha 1-antitrypsin ];

(II) Process which generates the immunoglobulin concentrate containing the immunoglobulin which does not contain substantially the component which processes the 2nd component under the existence of the 2nd electrophoresis demarcation membrane under the effect of potential, and has molecular weight smaller than an immunoglobulin;

(III) Process; which removes the component which processes an immunoglobulin concentrate under the existence of the 3rd electrophoresis demarcation membrane under the effect of potential, and has larger molecular weight than an immunoglobulin, and (IV) By moving alpha 1-antitrypsin through the 4th electrophoresis demarcation membrane under the effect of potential, it is related with the approach of coming to contain process; which separates albumin and alpha 1-antitrypsin from the pool of albumin/alpha 1-antitrypsin.

[0014]

Process I Removal of the inclusion of albumin, alpha 1-antitrypsin, and small molecular weight Process I is : which comes to contain the following step preferably (a). The above-mentioned step separated from the 2nd solvent style with the limit film which has a molecular weight cut-off smaller than the 1st electrophoresis demarcation membrane and the 1st electrophoresis demarcation membrane in which it is the step which puts in plasma in the style of the 1st solvent, and the 1st solvent style has a molecular weight cut-off smaller than the molecular weight of albumin;

(b) Step which chooses the 1st solvent appropriation buffer which has pH higher than pl of albumin;

(c) Although potential is applied between [ of two ] solvent styles and the albumin to the inside of the 2nd solvent style and migration of alpha 1-antitrypsin are made to cause through the 1st electrophoresis film The biomolecule which has larger molecular weight than albumin and alpha 1-antitrypsin is substantially held in the style of the 1st solvent. Or the biomolecule in the plasma which prevents passing the 1st electrophoresis film substantially and has molecular weight smaller than albumin and alpha 1-antitrypsin here if it advances into the 1st electrophoresis film is a step moved to waste recovery through the 1st demarcation membrane and the limit film;

(d) Step into which all of the albumin or alpha 1-antitrypsin which entered here in the style of the 2nd solvent are not made to re-advance substantially in the style of the 1st solvent although stop or reverse potential periodically depending on the case, migration of the biomolecule which has larger molecular weight than the albumin and alpha 1-antitrypsin which advanced into the 1st electrophoresis film is made to cause and back-migration is carried out into the 1st solvent style;

(e) The step which collects the desired albumin and alpha 1-antitrypsin of an amount as a pool of albumin/alpha 1-antitrypsin, and maintains a step (d) depending on a step (c) and the case until it will remove the biomolecule which has molecular weight smaller than albumin and alpha 1-antitrypsin from the 1st solvent style, and produces processing plasma.

[0015]

Process II Removal of the inclusion of large molecular weight Process II is : which comes to contain the following step preferably (f). The above-mentioned step separated from the 4th solvent style by the 2nd electrophoresis demarcation membrane in which it is the step which puts in processing plasma 3rd in the style of a solvent, and the 3rd solvent style has a molecular weight cut-off smaller than the molecular weight of an immunoglobulin;

(g) Step which chooses the 3rd solvent appropriation buffer which has pH higher than neutrality;

(h) Although migration of the biomolecule which applies potential between the 3rd solvent style and the 4th solvent style, and has molecular weight smaller than the immunoglobulin in the processing plasma to the inside of the 4th solvent style through the 2nd electrophoresis demarcation membrane is made to cause Step which will prevent passing the 2nd electrophoresis demarcation membrane substantially if the biomolecule which has larger molecular weight than an immunoglobulin and an immunoglobulin is substantially held in the style of the 3rd solvent or it advances into the 2nd electrophoresis demarcation membrane;



(i) Step into which all of biomolecule that have molecular weight smaller than the immunoglobulin which entered here in the style of the 4th solvent although stop or reverse potential periodically depending on the case, migration of other biomolecules which have larger molecular weight than the immunoglobulin and immunoglobulin which advanced into the 2nd electrophoresis demarcation membrane is made to cause and back-migration is carried out into the 3rd solvent style are not made to re-advance substantially in the style of the 3rd solvent;

(j) Step which maintains (i) depending on a step (h) and the case until it will remove the amount of the request of biomolecule which has molecular weight smaller than an immunoglobulin from the 3rd upstream, and produces an immunoglobulin concentrate;

(k) The step which removes a top Norio object molecule from the 4th solvent style.

[0016]

Process III Separation of an immunoglobulin Process III is : which comes to contain the following step preferably (l). Step which replaces the 2nd electrophoresis demarcation membrane with the 3rd electrophoresis demarcation membrane which has a larger molecular weight cut-off than the molecular weight of an immunoglobulin;

(m) Step which chooses the buffer for immunoglobulin concentrates which has pH lower than neutrality;

(n) Although migration of the immunoglobulin which applies potential between the 3rd solvent style containing an immunoglobulin concentrate and the fresh 4th solvent style, and is contained in the immunoglobulin concentrate of the 3rd solvent style to the inside of the fresh 4th solvent style through the 3rd electrophoresis demarcation membrane is made to cause Step which will prevent passing the 3rd electrophoresis demarcation membrane substantially if the biomolecule which has bigger molecular weight than an immunoglobulin is substantially held in the style of the 3rd solvent or it advances into the 3rd electrophoresis demarcation membrane;

(o) Step which is not made to re-advance substantially in the style of [ finishing / processing of all of an immunoglobulin that entered in the style of / fresh here / the 4th solvent / although stop or reverse potential periodically depending on the case, migration of the biomolecule which has larger molecular weight than the immunoglobulin which advanced into the 3rd electrophoresis demarcation membrane is made to cause and back-migration is carried out into the 3rd solvent style / finishing / processing ] the 3rd solvent;

(p) The step which maintains (o) depending on a step (n) and the case until it will move the amount of a desired immunoglobulin to the 4th fresh lower stream of a river.

[0017]

Process IV Separation from the alpha 1-antitrypsin of albumin Process IV is : which comes to contain the following step preferably (q). The above-mentioned step separated from the 6th solvent style by the 4th electrophoresis demarcation membrane in which it is the step which puts in albumin / alpha 1-antitrypsin concentrate in the style of the 5th solvent, and the 5th solvent style has a molecular weight cut-off smaller than the molecular weight of albumin;

(r) Step which chooses the 5th solvent appropriation buffer which has pH higher than neutrality;

(s) Step which will prevent passing the 4th electrophoresis demarcation membrane substantially if albumin is substantially held in the style of the 5th solvent or it advances into the 4th electrophoresis demarcation membrane, although potential is applied between the 5th solvent style and the 6th solvent style and migration of the alpha 1-antitrypsin to the inside of the 6th solvent style is made to cause through the 4th electrophoresis demarcation membrane;

(t) Although stop or reverse potential periodically depending on the case, migration of the albumin which advanced into the 4th electrophoresis demarcation membrane is made to cause and back-migration is carried out into the 5th solvent style Step; and (u) into which all of the alpha 1-antitrypsin which entered here in the style of the 6th solvent are not made to re-advance substantially in the style of the 5th solvent Until it will leave the amount of desired albumin in the style of the 5th solvent and will remove the amount of desired alpha 1-antitrypsin to the 6th solvent style The step which maintains (t) depending on a step (s) and the case.



[0018]

This invention may be performed about successive separation of two or more components from plasma before the process II which comes to include [ step (f) - (p) ] the process IV which comes to contain step (q) - (u). Process I and first step (a) - (e) generate the processed plasma in the albumin / alpha 1-antitrypsin pool in two products, i.e., a lower stream of a river, and the upstream. The immunoglobulin, the albumin, and alpha 1-antitrypsin which processed each of these two products further and isolated it are generated.

[0019]

Preferably, albumin, an immunoglobulin, and alpha 1-antitrypsin are separated from the pooled human plasma sample.

[0020]

Especially this invention is suitable for separation of immunoglobulin G (IgG).

[0021]

Preferably, the 1st electrophoresis demarcation membrane of a step (a) has the molecular weight cut-off of about 75 kDa, and the limit film has the molecular weight cut-off of about 50 kDa. Before a demarcation membrane and the limit film, the additional film can be put on middle or the back, and the separation approach can also be strengthened further.

[0022]

Preferably, pH of the buffer of a step (b) is about 9. It is found out that the Tris boric-acid buffer is suitable for especially this separation. However, other buffers which have suitable pH range being suitable, and dealing in them will be understood.

[0023]

Preferably, the 2nd electrophoresis demarcation membrane of a step (f) has the molecular weight cut-off of about 200 kDa. The 3rd electrophoresis demarcation membrane of a step (l) has the molecular weight cut-off of about 500 kDa preferably.

[0024]

pH of the buffer of the 3rd solvent style of a step (g) is about 9, and has about 4.6 pH preferably in a pan with the buffer of the 3rd processed solvent style of a step (m) lower than about 5.

[0025]

Preferably, the 4th electrophoresis demarcation membrane of a step (q) has the molecular weight cut-off of about 50 kDa(s).

[0026]

Preferably, pH of the buffer of a step (r) is about 8.0. It is found out that the Tris boric-acid buffer is suitable for especially this separation. However, other buffers which have suitable pH range being suitable, and dealing in them will be understood.

[0027]

It turns out that the potential of 250 volts is suitable for a separation process. Depending on the volume of the demarcation membrane to be used and plasma or the processed matter to separate, and a necessary separation rate, it is more high, or other lower electrical potential differences are suitable, and it obtains.

[0028]

Preferably, the 1st and 2nd solvent style forms the part of the 1st Gradiflow (trademark) equipment, and the 3rd and 4th solvent style forms the part of the 2nd Gradiflow (trademark) equipment.

[0029]

the refined albumin is larger than pH 8 using the Gradiflow (trademark) system combined with the electrophoresis demarcation membrane which has a molecular weight cut-off smaller than the molecular weight of albumin -- in abbreviation pH 8.4, you may condense preferably.

[0030]

The profits of the approach by the 1st mode of this invention are to be able to scale up without getting worse the property of the plasma component to separate.

[0031]

the plasma sample pooled by the approach of this invention to at least 90% of purity -- albumin and an

immunoglobulin -- IgG and alpha 1-antitrypsin are preferably obtained with at least 70% of yield.

[0032]

the approach by this invention -- within one day after plasma -- desirable -- less than 12 hours and the albumin which refined substantially or was isolated within 6 hours still more preferably, and an immunoglobulin -- IgG and alpha 1-antitrypsin are obtained preferably. The separation rate and purity of the last component (albumin, an immunoglobulin, preferably IgG and alpha 1-antitrypsin) move forward greatly exceeding the advanced technology. The approach of this invention is high-speed not only making acquirable three major components (albumin, an immunoglobulin, preferably IgG and alpha 1-antitrypsin) by processing of one sample of plasma but, and very efficient.

[0033]

In the 2nd mode, this invention relates to the albumin from plasma, an immunoglobulin, and use of Gradiflow [ in / preferably / purification and/or separation of IgG and alpha 1-antitrypsin ] (trademark).

[0034]

the 3rd voice -- the albumin which set like and refined this invention by the approach of being the 1st mode of this invention, and an immunoglobulin -- it is preferably related with IgG and alpha 1-antitrypsin.

[0035]

In the 4th mode, this invention relates to the albumin which is the 3rd mode of this invention, an immunoglobulin, and the use in IgG, and medical [ desirable ] or veterinary medicine-application of alpha 1-antitrypsin.

[0036]

Purification of each plasma component is the important illustration of the capacity of Gradiflow (trademark) which isolates a product from a complicated biological solution.

[0037]

When it cannot take in another semantics from the context through this specification The vocabulary "it comes to contain (comprise)", a conjugated form "it comes to contain (comprises)", or "it containing and becoming (comprising)" Although it means including the group of the described element (element), perfect field (integer), a phase (step) or an element, perfect field, or a phase It will be understood that it is not what means eliminating the group of other elements, perfect field, a phase or an element, perfect field, or a phase.

[0038]

With reference to the following drawings, a desirable gestalt is explained so that this invention may be understood still more clearly and it may get.

[0039]

The operation format ingredient and approach reagent of this invention Especially, all chemistry articles were obtained from Sigma (St Louis, MO), as long as there was no notice. The boric acid was obtained from ICN (Costa Mesa, CA). The methanol was obtained from Merck (Kilsyth, Vic).

[0040]

Tris boric-acid (TB) migration buffer: trisma base 6.5g, boric acid It is dilution and pH 9.0 to 1 L by 1.275g and deionization H2O.

[0041]

Tris boric-acid (TB) migration buffer: trisma base 7.74g, boric acid It is dilution and pH 8.0 to 1 L by 11.87g and deionization H2O.

[0042]

gamma-aminobutyric-acid-acetic-acid migration buffer: gamma-aminobutyric acid 3.165g, acetic acid It is dilution and pH 4.6 to 1 L by 1.08mL and deionization H2O.

[0043]

Gradipore glycine sample buffer: SDS 10% (w/v), glycerol 2.0mL, bromophenol blue 0.1% (w/v), tris-HCl (pH 6.8) It dilutes with 0.5M and deionization H2O to 10mL(s).

[0044]

Dithiothreitol (DTT): It is DTT 3mg per methanol 1mL.

[0045]

SDS glycine migration buffer: tris base 2.9g, glycine 14.4g, SDS It is dilution and pH 8.3 to 1 L by 1g and deionization H2O.

[0046]

Towbin buffer: tris 25mM, glycine 192mM, methanol It is dilution and pH 8.3 to 20% and deionization H2O.

[0047]

Phosphate buffered saline (PBS): NaCl 9g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g, Na<sub>2</sub>H.P.04 2.9g, KCl It is dilution and pH 7.2 to 1 L by 2g and deionization H2O.

[0048]

4-chloro-1-naphthol (4CN): It is 4CN 3mg per methanol 1mL.

[0049]

Gradipure (trademark): Coomassie Brilliant Blue <1% w/v, ammonium sulfate They are w/v and orthophosphoric acid about 10%. They are v/v and a methanol about 1%. It is v/v about 20%.

[0050]

Albumin isolation The one section of the pooled normal plasma was diluted in the three sections using a Tris boric-acid (TB) migration buffer and pH 9.0, and it put into the upstream of Gradiflow (trademark) equipment. In 1 process process, it isolated from the plasma which does not contain a platelet using an albumin charge [ in / for albumin / pH higher than the isoelectric point ], and its molecular weight. 75 The separation cartridge which has a kDa cut-off demarcation membrane has been arranged between two 50 kDa cut-off limit film. A separation unit is crossed, 250 volts is bet, and while migration of the albumin which lets a demarcation membrane pass removed albumin from higher molecular weight inclusion, dissipation of the inclusion of smaller molecular weight was carried out through 50 kDa cut-off limit film. Albumin was collected for 180 minutes on the whole at intervals of 30 minutes.

[0051]

The purity of a preparation object was determined using SDS PAGE (Gradipore Tris-glycine 8 - 16% inclination gel), and the size exclusion HPLC.

[0052]

A bromocresol green kit (BCG) comes to hand by Trace Scientific (Clayton, Melbourne, Australia). This is used through the whole isolation process. Albumin concentration The quantum was carried out (). [ Doumas BT, ] [ Watson ] Measurement of the serum albumin using WA, a Briggs HG."albumin criterion, and bromocresol green" () [ Albumin standards and the measurement of serum ] albumin with bromocresol green, Clin.Chimm.Acta, 31 (1971) p.87. Analysis was performed according to a manufacturer's instructions.

[0053]

Immunoglobulin (IgG) isolation The upper residue obtained from albumin isolation was further processed using a 200 kDa cut-off separation cartridge, and TB migration buffer and pH 9.0. The separation unit was crossed and the potential of 250 volts was applied for 1 hour. The combination of the size of this film and the low charge antimere quantitative ratio of IgG in pH 9 enables inclusion of smaller molecular weight to pass the film at the same time it restricts IgG migration, and it leaves the inclusion of IgG and higher molecular weight to the upstream. The 2nd purification process was performed over 2 hours using the 500 kDa cut-off demarcation membrane by pH 4.6. When the reverse polar potential of 250 volts was applied, IgG left the inclusion of other amounts of macromolecules to the upstream, and moved through the demarcation membrane.

[0054]

The Western blot analysis Towbin et al. (1979) () [ Towbin ] H and Staehelin T It reaches. Gordon J., "the electrophoresis shift:approach from proteinic polyacrylamide gel to a nitrocellulose sheet and two or more application" () [ Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide ] gels to nitrocellulose sheets : As procedure and some applications.Proc Natl Acad Sci USA 1979 and 76:4350 indicated It carried out on the selected SDS gel. A blotting filter paper and the nitrocellulose blotting film were front-immersed in the Towbin buffer for 60 minutes. Protein shift was performed for 90 minutes by 12V

using half-desiccation blotting equipment (Macquarie University, Sydney, Australia). The film was washed for 5 minutes using PBS, and it blocked for 10 minutes using PBS containing skim milk 1%. It dyed for 60 minutes using the 1% skim milk 10ml solution containing 20microL of rabbit anti-Homo sapiens IgA, IgG, and IgM who combined horseradish peroxidase (HRP) for the film, a kappa chain, and a lambda chain. Dyeing was developed using 4CN(s) which diluted the one section with PBS of the five sections, and were set to volume 10mL, and H<sub>2</sub>O 210microL. The development of a blot took place within 30 minutes.

[0055]

Alpha 1-antitrypsin isolation Further, the down-stream product of albumin purification was processed using TB migration buffer and pH 8.0, while using 50 kDa cut-off demarcation membrane. The potential of 250 volts was impressed to the separation unit for 3 hours. Alpha 1-antitrypsin moved down-stream and collected these during per hour. The albumin furthermore refined remained in the upstream. The purity of a sample was analyzed using SDS PAGE.

[0056]

Western blot analysis was carried out on the selected SDS gel, as Towbin and others (1979) (Towbin H, Staehelin T and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979, 76:4350) indicated. A blotting filter paper and the nitrocellulose blotting film carried out preliminary immersion for 60 minutes into the Towbin buffer. Protein migration was carried out for 60 minutes by 15V using half-desiccation blotting equipment (Biorad). The film was washed for 5 minutes using PBS, and it blocked for 10 minutes using PBS/0.1% Tween 20 (v/v) containing skim milk 1%. The film was incubated for 60 minutes with 1% skim milk solution 10mL containing 10micro [ of monoclonal anti-Homo sapiens alpha 1-antitrypsin ] (Bioscience Resource Project, clone number 1102) L. Subsequently, the indicator of the film was carried out for 60 minutes using 1% skim milk solution containing DAKO rabbit anti-mouse HRP conjugate. Coloration was carried out using the solution and H<sub>2</sub>O 210microL which diluted the one section of 4CN in the five sections of PBS, and set the film to volume 10mL. The coloration of a blot happened within 30 minutes.

[0057]

Alpha 1-antitrypsin recovery was measured using a nephelometry meter and Behring Nephelometer 100 Analyzer (Dade Behring, Marburg, Germany). Assay was carried out according to a manufacturer's instructions using the rabbit anti-Homo sapiens alpha 1-antitrypsin nephelometer reagent (Dade Behring OSAZ 15).

[0058]

The functionality of alpha 1-antitrypsin was studied using pigmentation elastase neutralization assay. Elastase was diluted to 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, and 1:320 using pH 8.0 buffer (the elastase stock solution obtained from \*\* and Sigma was 32 U/ml). 50micro of each elastase diluent 1 was added to alpha 1-antitrypsin sample 50microL, and it was shaken for 15 minutes. The contrast set of a sample which combined each elastase diluent with the equivalent migration buffer was also prepared. 20micro of each mixture 1 was extracted with the pipet, it put into the well of a flat bottom microtiter plate, and 150micro (Pentapharm, Basel, Switzerland) of pH Pefa-ELA substrates 1 newly diluted to 1:100 using the buffer of 8.0 was added (\*\* and each vial were reconfigured using DMSO 1ml, and were saved at +4 degrees C). It acted as the monitor of the coloring on the wavelength of 405nm over 2 hours in the plate reader (Versamax, Molecular Devices) in 37 degrees C. each -- kinetics-analysis was performed by calculating Vmax which exceeds 20 points to a well. The plot of Vmax to elastase concentration was made on the log-log scale. The straight-line part of a plot was extrapolated in the direction of a x axis, and it asked for the anti trypsin concentration expressed with the elastase neutralization unit.

[0059]

Mixture of albumin was studied using the bromocresol green kit (BCG) supplied by Trace Scientific (Clayton, Melbourne, Australia) (Doumas BT, Watson WA, Briggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin. Chim. Acta, 31 (1971) p.87). Analysis was carried out according to a manufacturer's instructions.

[0060]

Mixture of antithrombin III was studied using ELISA assay. Heparin (1.5 mg/mL) 100microL was applied to the flat bottom microtiter plate overnight, and was combined with it. The plate was washed 3 times by PBS/Tween 20(0.1% v/v) 250microL, and antithrombin III criteria (Sigma, St Louis, MO) 50microL, upper sample 50microL, and down-stream sample 50microL (1:10 PBS/Tween 20) were applied after that. It incubated at the room temperature for 1 hour, and the plate was again washed by PBS/Tween 20. a DAKO rabbit -- anti- -- Homo sapiens antithrombin III(1:1000 PBS/Tween 20) 50microL was applied, and the plate was incubated for further 1 hour. subsequently, a plate -- washing -- a DAKO goat -- anti- -- rabbit HRP conjugate 50microL was applied. The plate was washed, coloration was carried out using 100micro [ of ortho toluidine ] L, and, subsequently the plate was incubated for 1 hour. Coloration was stopped using 3M HCl 50microL. The plate was read by 450nm and it compared with the criteria curve which created the sample.

[0061]

SDS PAGE (Laemmli U.Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-four(cutting of structural protein of head construction process of bacteriophage T four).Nature 1970; 227:680-685) was carried out using the Tris-glycine-SDS migration buffer. The SDS PAGE sample was prepared using Gradipore glycine sample buffer 40microL, DTT 10microL, and sample 50microL, and was boiled for 5 minutes. SDS PAGE was carried out for 90 minutes by 150 volts.

[0062]

All SDS PAGE gels were dyed using Gradipure (trademark) (Gradipore, Sydney, Australia).

[0063]

HPLC is 4.6x250mm of ZORBAX GF 250. It carried out using the Shimazu SCL-10A VP HPLC system combined with the analysis column. The sample was made to migrate by the 100 mM phosphoric-acid buffer which contains 200 mM NaCl in pH 7.

[0064]

Result albumin isolation The 1 step purification technique succeeded in obtaining the albumin of purity higher than 95% at 72% of recovery. SDS PAGE of drawing 1 illustrates the purification technique. Albumin was isolated from plasma (lane 2) by what (lanes 5-10) is moved to a lower stream of a river through 75 kDa demarcation membrane. The inclusion of smaller molecular weight passed 50 kDa limit film, and disappeared. Albumin was collected for 180 minutes on the whole at intervals of 30 minutes. Residual plasma protein was held for the upstream (lane 3), and this was used for the IgG purification performed later. Since albumin with single peak purity was isolated from plasma, it compared with the commercial product for a therapy (drawing 2). It compared with the preparation object for a therapy of marketing of the albumin prepared using the Gradiflow (trademark) technique. HPLC was carried out using the Shimazu SCL-10A VP HPLC system combined with 4.6x250mm analysis column of ZORBAX GF 250. The sample was made to migrate by the 100 mM phosphoric-acid buffer which contains 200 mM NaCl in pH 7. Time amount only took 3 hours to the whole purification process, and it illustrates the quick nature of this approach. Processing of the albumin preparation object in isolation of alpha 1-antitrypsin raised the purity of a Gradiflow albumin product further.

[0065]

Immunoglobulin (IgG) isolation Processing of the residual upstream obtained from albumin separation reduced the trash of an important plasma component through the whole process. Furthermore, the migration time amount of IgG isolation was shortened by removal of the albumin of the 1st purification process. Drawing 3 and drawing 4 show the Western blot analysis which and corresponds, and illustrate existence of the heavy chain of characteristic IgG and a light chain. [ reduction ] the residual plasma protein (lane 3) obtained from albumin isolation -- further -- although fractionation was carried out in 2 process process, the inclusion of molecular weight smaller than 200 kDa is removed at the 1st process. From the upstream, it was made to move to a lower stream of a river, and the 2nd process condensed the IgG component (lanes 3-6). The product obtained from the process 2 of purification was applied to Western blot, and it incubated with the DAKO anti-immunoglobulin antibody. The dyed band shows

that two or more immunoglobulin families were isolated from plasma (drawing 4). The purity of an immunoglobulin product was determined as 95 - 100% using PAGE electrophoresis (phoretix) (drawing 5). As compared with the preparation object for a commercial therapy, similar purity and a similar property were shown for the IgG preparation object refined by Gradiflow (trademark).

[0066]

By further processing of this product, a specific immunoglobulin family is isolated in this process, and a specific group's purity can be raised. Immunoglobulin yield was higher than 75%, as a result of calculating by having carried out the quantum using HPLC.

[0067]

Alpha 1-antitrypsin isolation Alpha 1-antitrypsin was refined with 73% of recovery from the albumin preparation object refined by Gradiflow (trademark). Drawing 6 illustrates the purity of acquirable alpha 1-antitrypsin using this invention, and the capacity to refine the functional protein using a Gradiflow (trademark) technique is proved [ drawing 6 ] with maintenance of biological activity. It isolated by migration (lanes 7-9) on the lower stream of a river which let 50 kDa demarcation membrane pass from the albumin (lane 2) which refined alpha 1-antitrypsin by Gradiflow (trademark). Alpha 1-antitrypsin were collected for 180 minutes on the whole at intervals of 60 minutes. Residual albumin was held for the upstream (lanes 3-5). Removal of the alpha 1-antitrypsin from an albumin preparation object brought about the albumin of higher purity, and the time amount of alpha 1-antitrypsin isolation also shortened it. Other advantages acquired by processing of a Gradiflow (trademark) fraction were reduction of the trash of important plasma protein. Maintenance of alpha 1-antitrypsin activity was proved by the capacity which checks elastase activity. The activity which can be detected in an albumin preparation object did not remain.

[0068]

Drawing 7 shows the Western blot analysis of the 8-16% nonreduction SDS PAGE. Through isolated 50 kDa demarcation membrane from the albumin (lane 1) which refined alpha 1-antitrypsin by Gradiflow (trademark) by migration (lanes 6-8) on a lower stream of a river. Although drawing 8 showed the alpha 1-antitrypsin functional analysis, alpha 1-antitrypsin biological activity was studied using pigmentation elastase inhibition assay. The alpha 1-antitrypsin fraction refined by Gradiflow (trademark) indicated activity to be a residual albumin product by contrast.

[0069]

It was shown that it is 0.061 mg/mL even if the mixture of the albumin of an alpha 1-antitrypsin product which has activity is high. the need for the superfluous albumin mixture removal step using the usual isolation technique -- \*\*\*\* -- it is small. the nonexistence of the antithrombin III from an alpha 1-antitrypsin preparation object illustrates the separative power which was markedly alike and was excellent. [ of the Gradiflow technique ]

[0070]

Coincidence separation The current law for plasma protein separation may take three to 5th day for dividing protein into those refined gestalten including use of a drawing technique by Cohn. If a Gradiflow (trademark) technique is used, it is possible to shorten separation time amount even from the 3rd to 3 hours substantially. By connecting two or more Gradiflow (trademark) devices, it is possible from plasma to be the 3 same hours as requiring for separating each protein at single band purity, respectively, and to carry out coincidence separation of two or more protein. By connecting two or more Gradiflow (trademark) equipments with a serial together, it can separate into the fraction from which the plurality of different purification protein differs, and plasma can be collected by separate \*\*. Since Gradiflow (trademark) has linear scalability (linear scalability), it enables it to separate two or more protein in 1 time of 3 hours that it takes 2 to 3 hours by min per 1 protein when one set only of a device can be used.

[0071]

The plasma diluted suitably is put into the 1st style of the 1st equipment, a 200 kDa demarcation membrane is passed, and it dissociates. The demarcation membrane chosen at this step has two functions. The hole size of this film can pass all albumin and alpha 1-antitrypsin down-stream, and can



refine two protein further on a lower stream of a river. Furthermore, this film makes it possible to remove all the protein inclusion that has molecular weight smaller than 200 kDa from the immunoglobulin and other amount components of macromolecules which are held at the 1st style.

[0072]

80 Process the lower stream of a river from the 1st equipment using the 2nd Gradiflow (trademark) equipment equipped with a kDa demarcation membrane. although this film passes only albumin and alpha 1-antitrypsin all over the 3rd lower stream of a river -- bigger inclusion -- all -- the -- it holds in 2 style. 40 Connect the 3rd equipment equipped with a kDa demarcation membrane to the 2nd equipment, and process the 3rd lower stream of a river containing albumin and alpha 1-antitrypsin. Although migration of the albumin from the 3rd style is prevented by choosing this film, alpha 1-antitrypsin is passed and it collects by the 4th style. After this separation, pure albumin remains in the 3rd style substantially, and pure alpha 1-antitrypsin are substantially collected by the 4th style.

[0073]

albumin and alpha 1-antitrypsin -- those separation styles and order -- the [ the 3rd style and ] -- if it dissociates into 4 style, subsequently IgG is separable from the 1st processed style. This is performed by removing the 1st equipment from the 2nd and 3rd equipment, and changing pH of a buffer. gamma-aminobutyric acid / acetic-acid buffer of pH 4.6 are suitable, and the potential is reversed as well as the protocol of the 2nd usual process of IgG separation.

[0074]

All three sorts of protein, albumin, the alpha 1-antitrypsin, and IgG are separable with 80% or more of yield to single band purity by using the equipment of this combination. Although it takes both albumin and alpha 1-antitrypsin about 3 hours to refine, since IgG needs to separate three equipments after having separated albumin and alpha 1-antitrypsin, it starts several more hours for a long time.

[0075]

Conclusion The approach of refining albumin, IgG, and alpha 1-antitrypsin at high speed was established from the plasma of the single volume. The possibility of the Gradiflow (trademark) technique in large-scale purification of blood protein is proved [ exclusion / of various processing steps, such as minimum-izing, ethanol precipitate, an ultrafiltration, etc. of trash, ]. If this process is optimized, it can become possible to even take out the specific family and specific kind of an immunoglobulin. By processing of the further Gradiflow (trademark) trash fraction, many other important plasma molecules can be taken out and the approach of making the maximum possibility of the plasma as a living thing physic source of supply is offered. It will become possible to take out by carrying out targetting of the specific molecule and applying a suitable approach with the high singularity of a Gradiflow (trademark) technique.

[0076]

He will understand that various corrections and/or alterations do, without deviating from the pneuma or the range of this invention indicated generally to this invention shown in the specific operation gestalt, if it is this contractor. Therefore, it must be thought that the operation gestalt of this invention is not what is all points, is instantiation and is restricted.

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1]

Drawing 1; 8 - 16% nonreduction sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide-gel-electrophoresis (SDS PAGE) gel. Albumin was isolated from plasma (lane 2) by migration on a lower stream of a river through 75 kDa demarcation membrane (lanes 5-10). The inclusion of small molecular weight passed and carried out dissipation of the 50 kDa limit film. Albumin is 30-minute spacing and was collected for 180 minutes on the whole. Residual plasma protein was held for the upstream (lane 3), and, subsequently performed IgG purification.

[Drawing 2]

Drawing 2; size exclusion high performance liquid chromatography (HPLC). It compared with the adjustment object for a therapy of marketing of the albumin prepared using the Gradiflow (trademark) technique. HPLC is 4.6x250mm of ZORBAX GF 250. It carried out using the Shimazu SCL-10A VP



HPLC system combined with the analysis column. The sample was passed by the 100 mM phosphoric-acid buffer which contains 200 mM NaCl in pH 7.

[Drawing 3]

Drawing 3; 4 - 20% reduction SDS PAGE gel. the residual plasma protein (lane 3) obtained from albumin isolation -- further -- fractionation was carried out in 2 process process, and small inclusion was removed from 200 kDa at the 1st process. At the 2nd process, the IgG component was made to shift to a lower stream of a river from the upstream, and the IgG component was condensed (lanes 3-6).

[Drawing 4]

Drawing 4; Western blot analysis of 4 - 20% reduction SDS PAGE gel. The product obtained from the process 2 of purification was applied to Western blot, and it incubated with the DAKO anti-immunoglobulin antibody. The dyed band shows that two or more immunoglobulin families were isolated from plasma. Each family will be able to be refined if a sample is furthermore processed.

[Drawing 5]

Drawing 5; nonreduction SDS PAGE migration (phoretix). It compared with the therapy preparation object of marketing of the IgG preparation object refined by Gradiflow (trademark).

[Drawing 6]

Drawing 6; 8 - 16% nonreduction SDS PAGE. Alpha 1-antitrypsin was isolated from the albumin (lane 2) refined by Gradiflow (trademark) by migration on a lower stream of a river through 50 kDa demarcation membrane (lanes 7-9). Alpha 1-antitrypsin were collected for 180 minutes on the whole at intervals of 60 minutes. Residual albumin was held for the upstream (lanes 3-5).

[Drawing 7]

Drawing 7; Western blot of the 8 - 16% nonreduction SDS PAGE. Alpha 1-antitrypsin was isolated from the albumin (lane 1) refined by Gradiflow (trademark) by migration on a lower stream of a river through 50 kDa demarcation membrane (lanes 6-8).

[Drawing 8]

Drawing 8; alpha 1-antitrypsin functional analysis. Alpha 1-antitrypsin biological activity was studied using pigmentation elastase inhibition assay. The Gradiflow (trademark) alpha 1-antitrypsin fraction indicated activity to be a residual albumin product by contrast.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and NCIPi are not responsible for any  
damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

PRIOR ART

---

(Allen PC, Hill EA, Stokes AM in Plasma Proteins Analytical and Preparative Techniques

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
 特表2002-542163  
 (P2002-542163A)

(43) 公表日 平成14年12月10日 (2002.12.10)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	7-41-1* (参考)
C 0 7 K 1/26		C 0 7 K 1/26	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/14		A 6 1 K 35/14	C 4 H 0 4 5
35/16		35/16	
A 6 1 P 7/00		A 6 1 P 7/00	
7/08		7/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 38 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-611549 (P2000-611549)  
 (86) (22) 出願日 平成12年4月12日 (2000.4.12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成13年10月12日 (2001.10.12)  
 (86) 国際出願番号 P C T / A U 0 0 / 0 0 3 0 8  
 (87) 国際公開番号 W O 0 0 / 6 1 6 0 7  
 (87) 国際公開日 平成12年10月19日 (2000.10.19)  
 (31) 優先権主張番号 P P 9 7 1 3  
 (32) 優先日 平成11年4月12日 (1999.4.12)  
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 グラディボア リミテッド  
 オーストラリア国 2086, ニュー サウス  
 ウォールズ, フレンチス フォレスト,  
 ロドブロウ ロード 22  
 (72) 発明者 ギルバート, アンドリュウ, マーク  
 オーストラリア国 2113 ニューサウスウ  
 ェールズ, ノース ライド, ヴィミエラ  
 ロード 62  
 (72) 発明者 コンラン, ブレンドン, フランシス  
 オーストラリア国 2122 ニューサウスウ  
 ェールズ, イーストウッド, ミルロイ ス  
 トリート 11  
 (74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血漿成分の分離

(57) 【要約】

血漿から成分を分離する方法であって、(I) 第1成分を電位の影響下で第1の電気泳動分離膜を通過して移動させることによって血漿を第1および第2成分に分離する工程であって、第1成分はアルブミン/ $\alpha_1$ アンチトリプシンプールを含んでなりかつ第2成分はアルブミンより大きい分子量を有する成分を含有する血漿を含んでなる上記工程；(II) 第2成分を電位の影響下で第2の電気泳動分離膜の存在のもとで処理して、免疫グロブリンより小さい分子量を有する成分を実質的に含まない免疫グロブリンを含有する免疫グロブリン濃縮物を生成する工程；(III) 免疫グロブリン濃縮物を電位の影響下で第3の電気泳動分離膜の存在のもとで処理して、免疫グロブリンより大きい分子量を有する成分を除去する工程；および(IV)  $\alpha_1$ アンチトリプシンを電位の影響下で第4の電気泳動分離膜を通過して移動させることによって、アルブミン/ $\alpha_1$ アンチトリプシンプールからアルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンを分離する工程を含んでなる上記方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 血漿から成分を分離する方法であって、

(I) 第1成分を電位の影響下で第1の電気泳動分離膜を通して移動させることによって血漿を第1および第2成分に分離する工程であって、第1成分はアルブミン/ $\alpha_1$ アンチトリプシンのプールを含んでなりかつ第2成分はアルブミンより大きい分子量を有する成分を含有する血漿を含んでなる上記工程；

(II) 第2成分を電位の影響下で第2の電気泳動分離膜の存在のもとで処理して、免疫グロブリンより小さい分子量を有する成分を実質的に含まない免疫グロブリンを含有する免疫グロブリン濃縮物を生成する工程；

(III) 免疫グロブリン濃縮物を電位の影響下で第3の電気泳動分離膜の存在のもとで処理して、免疫グロブリンより大きい分子量を有する成分を除去する工程；  
および

(IV)  $\alpha_1$ アンチトリプシンを電位の影響下で第4の電気泳動分離膜を通過して移動させることによって、アルブミン/ $\alpha_1$ アンチトリプシンのプールからアルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンを分離する工程を含んでなる方法。

【請求項2】 工程Iが、

(a) 血漿を第1溶媒流に入れるステップであって、第1溶媒流は、第2溶媒流からアルブミンの分子量より小さい分子量カットオフを有する第1電気泳動分離膜によっておよび該第1電気泳動分離膜より小さい分子量カットオフを有する制限膜によって分離されている上記ステップ；

(b) アルブミンのpIより高いpHを有する第1溶媒流用バッファーを選択するステップ；

(c) 2つの溶媒流間に電位を適用して、第1電気泳動膜を通して第2溶媒流中へのアルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンの移動を起こさせるが、アルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンより大きい分子量を有する生体分子を実質的に第1溶媒流に保持し、あるいは、もし第1電気泳動膜に進入すれば、実質的に第1電気泳動膜を通過することを阻止し、ここでアルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンより小さい分子量を有する血漿中の生体分子は第1分離膜および制限膜を通して廃棄物堆積へ移動させるステップ；

(d) 場合によっては、定期的に電位を停止または逆転し、第1電気泳動膜に進入したアルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンより大きい分子量を有する生体分子の移動を起こさせて第1溶媒流中に逆移動させるが、ここに第2溶媒流に入ったアルブミンまたは $\alpha_1$ アンチトリプシンのいずれをも第1溶媒流に実質的に再進入させないステップ；および

(e) 所望の量のアルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンをアルブミン/ $\alpha_1$ アンチトリプシンのプールとして回収しかつアルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンより小さい分子量を有する生体分子を第1溶媒流から除去してしまうまでステップ(c)および場合によってはステップ(d)を維持して、処理血漿を作製するステップを含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 工程IIが、

(f) 処理血漿を第3の溶媒流に入れるステップであって、第3溶媒流は免疫グロブリンの分子量より小さい分子量カットオフを有する第2電気泳動分離膜によって第4溶媒流から分離されている上記ステップ；

(g) 中性より高いpHを有する第3溶媒流用バッファーを選択するステップ；

(h) 第3溶媒流と第4溶媒流との間に電位を適用して、第2電気泳動分離膜を通して第4溶媒流中への処理血漿中の免疫グロブリンより小さい分子量を有する生体分子の移動を起こさせるが、免疫グロブリンおよび免疫グロブリンより大きい分子量を有する生体分子を実質的に第3溶媒流に保持し、あるいはもし第2電気泳動分離膜に進入すれば、実質的に第2電気泳動分離膜を通過することを阻止するステップ；

(i) 場合によっては、定期的に電位を停止もしくは逆転し、第2電気泳動分離膜に進入した免疫グロブリンおよび免疫グロブリンより大きい分子量を有する他の生体分子の移動を起こさせて第3溶媒流中に逆移動させるが、ここに第4溶媒流に入った免疫グロブリンより小さい分子量を有する生体分子のいずれをも第3溶媒流に実質的に再進入させないステップ；

(j) 免疫グロブリンより小さい分子量を有する生体分子の所望の量を第3上流から除去してしまうまでステップ(h)および場合によっては(i)を維持して、免疫グロブリン濃縮物を作製するステップ；および

(k) 第4溶媒流から上記生体分子を除去するステップを含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 工程IIIが、

(l) 第2電気泳動分離膜を、免疫グロブリンの分子量より大きい分子量カットオフを有する第3電気泳動分離膜と置き換えるステップ；

(m) 中性以下のpHを有する免疫グロブリン濃縮物用バッファーを選択するステップ；

(n) 第3溶媒流の免疫グロブリン濃縮物と新鮮な第4溶媒流との間に電位を適用して、第3電気泳動分離膜を通して新鮮な第4溶媒流中への第3溶媒流中の免疫グロブリン濃縮物に含まれる免疫グロブリンの移動を起こさせるが、免疫グロブリンより大きな分子量を有する生体分子を実質的に第3溶媒流に保持し、あるいはもし第3電気泳動分離膜に進入すれば、実質的に第3電気泳動分離膜を通過することを阻止するステップ；

(o) 場合によっては、定期的に電位を停止もしくは逆転し、第3電気泳動分離膜に進入した免疫グロブリンより大きい分子量を有する生体分子の移動を起こさせて、処理済みの第3溶媒流中に逆移動させるが、ここに新鮮な第4溶媒流に入った免疫グロブリンのいずれをも処理済みの第3溶媒流に実質的に再進入させないステップ；および

(p) 所望の免疫グロブリンの量を新鮮な第4下流に移動してしまうまで、ステップ(n)および場合によっては(o)を維持するステップを含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 工程IVが、

(q) アルブミン/ $\alpha_1$ アンチトリプシン濃縮物を第5溶媒流に入れるステップであって、第5溶媒流はアルブミンの分子量より小さい分子量カットオフを有する第4電気泳動分離膜により第6溶媒流から分離されている上記ステップ；

(r) 中性より高いpHを有する第5溶媒流用バッファーを選択するステップ；

(s) 第5溶媒流と第6溶媒流との間に電位を適用して、第4電気泳動分離膜を通して第6溶媒流中への $\alpha_1$ アンチトリプシンの移動を起こさせるが、アルブミンを実質的に第5溶媒流に保持し、あるいはもし第4電気泳動分離膜に進入すれば、実質

的に第4電気泳動分離膜を通過することを阻止するステップ；

(t) 場合によっては、定期的に電位を停止もしくは逆転し、第4電気泳動分離膜に進入したアルブミンの移動を起こさせて、第5溶媒流中に逆移動させるが、ここに第6溶媒流に入った $\alpha_1$ アンチトリプシンのいずれをも第5溶媒流に実質的に再進入させないステップ；および

(u) 所望のアルブミンの量を第5溶媒流に残しかつ所望の $\alpha_1$ アンチトリプシンの量を第6溶媒流へ除去してしまうまで、ステップ(s)および場合によっては(t)を維持するステップを含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 工程IVが工程Iの後に実施される、請求項1、2または5に記載の方法。

【請求項7】 血漿がプールしたヒト血漿サンプルである、請求項1～6に記載の方法。

【請求項8】 ステップ(a)の第1電気泳動分離膜が約75 kDaの分子量カットオフを有しかつ制限膜が約50 kDaの分子量カットオフを有する、請求項2に記載の方法。

【請求項9】 ステップ(b)のバッファーのpHが9である、請求項2に記載の方法。

【請求項10】 バッファーがTrisホウ酸バッファーである、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 ステップ(f)の第2電気泳動分離膜が200 kDaの分子量カットオフを有する、請求項3に記載の方法。

【請求項12】 ステップ(g)の第3溶媒流のpHが9である、請求項3に記載の方法。

【請求項13】 ステップ(l)の第3電気泳動分離膜が500 kDaの分子量カットオフを有する、請求項4に記載の方法。

【請求項14】 ステップ(m)の免疫グロブリン濃縮物のバッファーのpHが5より低い、請求項4に記載の方法。

【請求項15】 バッファーのpHが4.6である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 ステップ(q)の第4電気泳動分離膜が約50 kDaの分子量カッ



トオフを有する、請求項5に記載の方法。

【請求項17】 ステップ(r)の第5溶媒流のバッファーのpHが8.0である、請求項5に記載の方法。

【請求項18】 バッファーがTrisホウ酸バッファーである、請求項17に記載の方法。

【請求項19】 ステップ(c)で250ボルトの電位を適用する、請求項2に記載の方法。

【請求項20】 ステップ(h)で250ボルトの電位を適用する、請求項3に記載の方法。

【請求項21】 ステップ(n)で250ボルトの電位を適用する、請求項4に記載の方法。

【請求項22】 ステップ(s)で250ボルトの電位を適用する、請求項5に記載の方法。

【請求項23】 免疫グロブリンが免疫グロブリンG (IgG) である、請求項1～22のいずれかに記載の方法。

【請求項24】 血漿からのアルブミン、免疫グロブリンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンの収率が少なくとも70%でありかつ純度が少なくとも90%である、請求項1～23のいずれかに記載の方法。

【請求項25】 アルブミン、免疫グロブリンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンが血漿から1日以内に分離される、請求項1～24のいずれかに記載の方法。

【請求項26】 アルブミン、免疫グロブリンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンが血漿から12時間以内に分離される、請求項25に記載の方法。

【請求項27】 アルブミン、免疫グロブリンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンが血漿から6時間以内に分離される、請求項25に記載の方法。

【請求項28】 ブールした血漿サンプルからアルブミン、免疫グロブリンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンの精製および／または分離におけるGradiflow (商標) 技術の利用。

【請求項29】 免疫グロブリンが免疫グロブリンG (IgG) である、請求項28に記載の利用。

【請求項30】 請求項1～27のいずれかに記載の方法により精製された、  
単離アルブミン、免疫グロブリン、および $\alpha_1$ アンチトリプシン。

【請求項31】 免疫グロブリンG (IgG) を含んでなる、請求項30に記載の  
単離した免疫グロブリン。

【請求項32】 請求項30に記載のアルブミン、免疫グロブリンおよび $\alpha_1$   
アンチトリプシンの医学的および獣医学的応用における使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 技術分野

本発明は、血漿、特にヒト血漿からの生体分子の分離に関する。

## 【0002】

## 背景技術

ヒト血漿は、様々な機能と治療用途の可能性を有する約3000種のタンパク質を含有する。血液分画に利用可能な血漿の厳格な規制は、IgGなどの重要な治療薬の供給が厳しく削減されることを意味する。これと共に、非常に低収率でありかつ3～5日を要する血液分画方法は、主要な血漿画分の国際的不足の原因となっている。

## 【0003】

本発明者らは、Gradiflow (商標) 技術が、高速単離時間、高回収率かつ高分解度によって、従来のCohn沈澱およびカラムクロマトグラフィーに代わる効果的な精製技術であることを見出した (Horvath SZ, Corthals GL, Wrigley CW および Margolis J., Multifunctional apparatus for electrokinetic processing of proteins(タンパク質の電気動力的処理用の多機能装置), Electrophoresis 1994; 15:968)。

## 【0004】

アルブミンおよびIgGは両方共に医学において非常に重要であり、従って相当な商業的価値をもつ。アルブミン単独で年間の世界市場価値は15億米ドルと見積もられる (SG Cowen, Perspectives Blood Transfusion Industry (輸血産業展望), October 1998, pp54)。従来の精製プロトコルは手間がかかり、そして低収率と長い処理時間のために高価である (Allen PC, Hill EA, Stokes AM in Plasma Proteins Analytical and Preparative Techniques (血漿タンパク質分析技術および調製技術), Blackwell Scientific Publications, London 1977, pp. 182-189)。

## 【0005】

アルブミンは、ヒト血漿中で最も多量に存在するタンパク質成分 (50mg/mL)

であり、全血液量および膠質浸透圧 (oncotic pressure) を維持する機能を果たす。アルブミンはまた、タンパク質、脂肪酸、ホルモンおよび薬物の輸送を調節する (Allen PC, Hill EA, Stokes AM in Plasma Proteins Analytical and Preparative Techniques, Blackwell Scientific Publications, London 1977, pp. 182-189)。臨床用途には、外科手術中の血液量置換、ショック、重篤な火傷および他の医療救急の治療、ならびに他の医薬品の安定化が挙げられる。

#### 【0006】

アルブミンは67kDaの分子量を有し、かつ約4.9の等電点 (pI) を有する。該タンパク質は、単一のサブユニットを有し、形状は球状である (Andersson LO, in Blomback B, Lars HA (編), Plasma Proteins (血漿タンパク質), A Wiley Interscience Publication New York, 1979, pp 43-45)。従来の精製スキームはCohnエタノール沈殿法を使い、50%の回収率しか得られない。

#### 【0007】

免疫グロブリンG(IgG)は最も多量に存在する免疫グロブリンであり、ヒト血清中の総免疫グロブリンの成分のほとんど70%に当たる。正常な血漿中のIgG濃度は約10mg/mLである (Bennich H in Blomback B, Lars HA (編), Plasma Proteins (血漿タンパク質), A Wiley Interscience Publication New York, 1979, pp 122)。IgGは免疫応答に本質的な役割を果たし、へびおよびクモによる噛み傷、神経障害の治療などの臨床用途を有し、またIgGは広く分析または診断キットに使用される。

#### 【0008】

γグロブリンは約150kDaの分子量を有し、4本鎖からなり、その2本は軽鎖であり、2本は重鎖である (Bennich H in Blomback B, Lars HA (編), Plasma Proteins, A Wiley Interscience Publication New York, 1979, pp 122)。免疫グロブリンは伝統的にCohnエタノール沈殿または代わりにアフィニティクロマトグラフィーを使って単離される (Allen PC, Hill EA, Stokes AM in Plasma Proteins Analytical and Preparative Techniques, Blackwell Scientific Publications, London 1977, pp. 178)。

#### 【0009】

$\alpha_1$  アンチトリプシンは、4.8の等電点を有する54 kDaの酸性糖タンパク質であり、遺伝性気腫の治療に使われる (Allen PC, Hill EA, Stokes AM in Plasma Proteins Analytical and Preparative Techniques, Blackwell Scientific Publications, London 1977, pp. 210-211)。従来の精製スキームはCohn分画およびカラムクロマトグラフィーの組合わせを利用し、主な難点は $\alpha_1$  アンチトリプシン調製物からアルブミンを除去することにある (Allen PC, Hill EA, Stokes AM in Plasma Proteins Analytical and Preparative Techniques, Blackwell Scientific Publications, London 1977, pp. 212)。現行生産スキームは約30%の収率を提供し、その多くはアルブミンが混在している。本発明者らは、Gradiflow<sup>TM</sup> を適用して、高純度の $\alpha_1$  アンチトリプシンを70%より高い収率で生産する代替技術を提供した。この方法はまた、Gradiflow (商標) 技術のプロテアーゼインヒビターを単離する際の利用も例証する。

#### 【0010】

##### Gradiflow (商標) 技術

Gradiflow (商標) 技術は、サイズおよび電荷の分子特性を利用し (Horvath S Z, Corthals GL, Wrigley CW and Margolis J. Multifunctional apparatus for electrokinetic processing of proteins, Electrophoresis 1994: 15: 968)、2次元電気泳動分離と分取クロマトグラフィー処理を用いてタンパク質を単離する。タンパク質は、その等電点 (pI) より高いかまたは低い荷電分子として存在する。Gradiflow (商標) においては、高分子の正味電荷をバッファーpHの選択によって制御する。タンパク質を電場において電荷および/またはサイズ差によって分離する。Gradiflow (商標) 技術の複数の例は、米国特許第5039386号および第5650055号に見られ、これらの米国特許は参照により本明細書に組み入れる。

#### 【0011】

本発明者らは、Gradiflow (商標) 技術を適用して、血漿から多数の異なる生体分子成分を精製できることを見出した。本発明者らは、単一容積の血漿からアルブミン、IgG および  $\alpha_1$  アンチトリプシンを、4工程 (phase) のプロセスにおいて高収率かつ低費用で高速単離する方法を案出した。

## 【0012】

発明の開示

一般的態様においては、本発明は、4つの主な分離工程またはプロセスを用いることを特徴とする、血漿サンプル中に存在する多数の生体分子の逐次的分離 (sequential separation) に関する。

## 【0013】

第1の態様においては、本発明は血漿から成分を分離する方法であって、次の工程：

(I) 第1成分を電位の影響下で第1の電気泳動分離膜を通して移動させることによって血漿を第1および第2成分に分離する工程であって、第1成分はアルブミン/ $\alpha_1$ アンチトリプシンのプールを含んでなり、かつ第2成分はアルブミンより大きい分子量を有する成分を含有する血漿を含んでなる上記工程；

(II) 第2成分を電位の影響下で第2の電気泳動分離膜の存在のもとで処理して、免疫グロブリンより小さい分子量を有する成分を実質的に含まない免疫グロブリンを含有する免疫グロブリン濃縮物を生成する工程；

(III) 免疫グロブリン濃縮物を電位の影響下で第3の電気泳動分離膜の存在のもとで処理して、免疫グロブリンより大きい分子量を有する成分を除去する工程；および

(IV)  $\alpha_1$ アンチトリプシンを電位の影響下で第4の電気泳動分離膜を通して移動させることによって、アルブミン/ $\alpha_1$ アンチトリプシンのプールからアルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンを分離する工程；を含んでなる方法に関する。

## 【0014】

工程I アルブミン、 $\alpha_1$ アンチトリプシンおよび小さい分子量の混在物の除去

好ましくは、工程Iは次のステップを含んでなる：

(a) 血漿を第1溶媒流に入れるステップであって、第1溶媒流が、アルブミンの分子量より小さい分子量カットオフを有する第1電気泳動分離膜および第1電気泳動分離膜より小さい分子量カットオフを有する制限膜によって第2溶媒流から分離されている上記ステップ；

(b) アルブミンのpIより高いpHを有する第1溶媒流用バッファーを選択するステ

ップ；

(c) 2つの溶媒流間に電位を適用して、第1電気泳動膜を通して第2溶媒流中へのアルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンの移動を起こさせるが、アルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンより大きい分子量を有する生体分子を実質的に第1溶媒流に保持し、あるいは、もし第1電気泳動膜に進入すれば、実質的に第1電気泳動膜を通過することを阻止し、ここでアルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンより小さい分子量を有する血漿中の生体分子は第1分離膜および制限膜を通して廃棄物回収へ移動させるステップ；

(d) 場合によっては、定期的に電位を停止または逆転し、第1電気泳動膜に進入したアルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンより大きい分子量を有する生体分子の移動を起こさせて第1溶媒流中に逆移動させるが、ここに第2溶媒流に入ったアルブミンまたは $\alpha_1$ アンチトリプシンのいずれをも第1溶媒流に実質的に再進入させないステップ；

(e) 所望の量のアルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンを、アルブミン/ $\alpha_1$ アンチトリプシンのプールとして回収し、そしてアルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンより小さい分子量を有する生体分子を第1溶媒流から除去してしまうまでステップ(c)および場合によってはステップ(d)を維持して、処理血漿を作製するステップ。

### 【0015】

#### 工程II 大きい分子量の混在物の除去

好ましくは、工程IIは次のステップを含んでなる：

(f) 処理血漿を第3の溶媒流に入れるステップであって、第3溶媒流が、免疫グロブリンの分子量より小さい分子量カットオフを有する第2電気泳動分離膜によって第4溶媒流から分離されている上記ステップ；

(g) 中性より高いpHを有する第3溶媒流用バッファーを選択するステップ；

(h) 第3溶媒流と第4溶媒流との間に電位を適用して、第2電気泳動分離膜を通して第4溶媒流中への処理血漿中の免疫グロブリンより小さい分子量を有する生体分子の移動を起こさせるが、免疫グロブリンおよび免疫グロブリンより大きい分子量を有する生体分子を実質的に第3溶媒流に保持し、あるいはもし第2電気泳動



分離膜に進入すれば、第2電気泳動分離膜を通過することを実質的に阻止するステップ；

(i) 場合によっては、定期的に電位を停止もしくは逆転し、第2電気泳動分離膜に進入した免疫グロブリンおよび免疫グロブリンより大きい分子量を有する他の生体分子の移動を起こさせて第3溶媒流中に逆移動させるが、ここに第4溶媒流に入った免疫グロブリンより小さい分子量を有する生体分子のいずれをも第3溶媒流に実質的に再進入させないステップ；

(j) 免疫グロブリンより小さい分子量を有する生体分子の所望の量を、第3上流から除去してしまうまでステップ(h)および場合によっては(i)を維持して、免疫グロブリン濃縮物を作製するステップ；

(k) 第4溶媒流から上記生体分子を除去するステップ。

#### 【0016】

#### 工程III 免疫グロブリンの分離

好ましくは、工程IIIは次のステップを含んでなる：

(l) 第2電気泳動分離膜を、免疫グロブリンの分子量より大きい分子量カットオフを有する第3電気泳動分離膜と置き換えるステップ；

(m) 中性より低いpHを有する免疫グロブリン濃縮物用バッファーを選択するステップ；

(n) 免疫グロブリン濃縮物を含む第3溶媒流と新鮮な第4溶媒流との間に電位を適用して、第3電気泳動分離膜を通して新鮮な第4溶媒流中への第3溶媒流の免疫グロブリン濃縮物に含まれる免疫グロブリンの移動を起こさせるが、免疫グロブリンより大きな分子量を有する生体分子を実質的に第3溶媒流に保持し、あるいはもし第3電気泳動分離膜に進入すれば、第3電気泳動分離膜を通過することを実質的に阻止するステップ；

(o) 場合によっては、定期的に電位を停止もしくは逆転し、第3電気泳動分離膜に進入した免疫グロブリンより大きい分子量を有する生体分子の移動を起こさせて、処理済みの第3溶媒流中に逆移動させるが、ここに新鮮な第4溶媒流に入った免疫グロブリンのいずれをも処理済みの第3溶媒流に実質的に再進入させないステップ；

(p) 所望の免疫グロブリンの量を新鮮な第4下流に移動してしまうまで、ステップ(n)および場合によっては(o)を維持するステップ。

### 【0017】

#### 工程IV アルブミンの $\alpha_1$ アンチトリプシンからの分離

好ましくは、工程IVは次のステップを含んでなる：

- (q) アルブミン/ $\alpha_1$ アンチトリプシン濃縮物を第5溶媒流に入れるステップであって、第5溶媒流が、アルブミンの分子量より小さい分子量カットオフを有する第4電気泳動分離膜により第6溶媒流から分離されている上記ステップ；
- (r) 中性より高いpHを有する第5溶媒流用バッファーを選択するステップ；
- (s) 第5溶媒流と第6溶媒流との間に電位を適用して、第4電気泳動分離膜を通して第6溶媒流中への $\alpha_1$ アンチトリプシンの移動を起こさせるが、アルブミンを実質的に第5溶媒流に保持し、あるいは、もし第4電気泳動分離膜に進入すれば、第4電気泳動分離膜を通過することを実質的に阻止するステップ；
- (t) 場合によっては、定期的に電位を停止もしくは逆転し、第4電気泳動分離膜に進入したアルブミンの移動を起こさせて、第5溶媒流中に逆移動させるが、ここに第6溶媒流に入った $\alpha_1$ アンチトリプシンのいずれをも第5溶媒流に実質的に再進入させないステップ；および
- (u) 所望のアルブミンの量を第5溶媒流に残しかつ所望の $\alpha_1$ アンチトリプシンの量を第6溶媒流へ除去してしまうまで、ステップ(s)および場合によっては(t)を維持するステップ。

### 【0018】

本発明は血漿からの複数成分の逐次的分離に関するものであり、ステップ(q)～(u)を含んでなる工程IVをステップ(f)～(p)を含んでなる工程IIの前に行ってもよい。工程I、最初のステップ(a)～(e)は2つの生成物、すなわち下流中のアルブミン/ $\alpha_1$ アンチトリプシンプールおよび上流中の処理済み血漿を生成する。これら2つの生成物のそれぞれをさらに処理して単離した免疫グロブリン、アルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンを生成する。

### 【0019】

好ましくは、アルブミン、免疫グロブリンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンは、プ

ールしたヒト血漿サンプルから分離する。

【0020】

本発明は特に免疫グロブリンG (IgG) の分離に適している。

【0021】

好ましくは、ステップ(a)の第1電気泳動分離膜は約75 kDaの分子量カットオフを有し、制限膜は約50 kDaの分子量カットオフを有する。分離膜と制限膜の前、中間または後に追加の膜を置いてさらに分離方法を強化することもできる。

【0022】

好ましくは、ステップ(b)のバッファーのpHは約9である。この分離にはTrisホウ酸バッファーが特に適していることが見出されている。しかし、適当なpH範囲を有する他のバッファーも適当でありうることは理解されるであろう。

【0023】

好ましくは、ステップ(f)の第2電気泳動分離膜は約200 kDaの分子量カットオフを有する。ステップ(l)の第3電気泳動分離膜は、好ましくは、約500 kDaの分子量カットオフを有する。

【0024】

好ましくは、ステップ(g)の第3溶媒流のバッファーのpHは約9であり、ステップ(m)の処理済み第3溶媒流のバッファーは約5より低い、さらに好ましくは約4.6のpHを有する。

【0025】

好ましくは、ステップ(q)の第4電気泳動分離膜は約50kDaの分子量カットオフを有する。

【0026】

好ましくは、ステップ(r)のバッファーのpHは約8.0である。この分離にはTrisホウ酸バッファーが特に適していることが見出されている。しかし、適当なpH範囲を有する他のバッファーも適当でありうることは理解されるであろう。

【0027】

250ボルトの電位が分離プロセスに適當であることが分かっている。使用する分離膜、血漿の容積または分離する処理済み物質、および所要の分離速度によっ

ては、より高いかまたはより低い他の電圧も適当であり得る。

【0028】

好ましくは、第1および第2溶媒流が第1のGradiflow(商標)装置の部分形成し、第3および第4溶媒流が第2のGradiflow(商標)装置の部分形成する。

【0029】

精製したアルブミンは、アルブミンの分子量より小さい分子量カットオフを有する電気泳動分離膜と組み合わせたGradiflow(商標)システムを使って、pH 8より大きい、好ましくは約pH 8.4において濃縮してもよい。

【0030】

本発明の第1の態様による方法の利益は、分離する血漿成分の性質を悪化することなしにスケールアップできることにある。

【0031】

本発明の方法により、プールした血漿サンプルから、少なくとも90%の純度で、アルブミン、免疫グロブリン、好ましくはIgG、および $\alpha_1$ アンチトリプシンを少なくとも70%の収率で得る。

【0032】

本発明による方法により、血漿から、1日以内、好ましくは12時間以内、そしてさらに好ましくは6時間以内に、実質的に精製したまたは単離したアルブミン、免疫グロブリン、好ましくはIgG、および $\alpha_1$ アンチトリプシンが得られる。最終成分(アルブミン、免疫グロブリン、好ましくはIgG、および $\alpha_1$ アンチトリプシン)の分離速度および純度は、先行技術を超えて大きく前進したものである。本発明の方法は、血漿の1サンプルの処理により3主要成分(アルブミン、免疫グロブリン、好ましくはIgG、および $\alpha_1$ アンチトリプシン)を取得可能とするだけでなく、高速でありかつ非常に効率的である。

【0033】

第2の態様においては、本発明は、血漿からのアルブミン、免疫グロブリン、好ましくはIgG、および $\alpha_1$ アンチトリプシンの精製および/または分離におけるGradiflow(商標)の利用に関する。

【0034】

第3の態様においては、本発明は、本発明の第1の態様である方法によって精製したアルブミン、免疫グロブリン、好ましくはIgG、および $\alpha$ 、アンチトリプシンに関する。

【0035】

第4の態様においては、本発明は、本発明の第3の態様であるアルブミン、免疫グロブリン、好ましくはIgG、および $\alpha$ 、アンチトリプシンの医学的または獣医学的応用における利用に関する。

【0036】

個々の血漿成分の精製は、複雑な生物学的溶液から生成物を単離するGradiflow(商標)の能力の重要な例証である。

【0037】

本明細書を通じて、文脈から別の意味にとれない場合は、用語「含んでなる (comprise)」または活用形「含んでなる (comprises)」または「含んでなる (comprising)」は、記述した要素 (element)、完全体 (integer) もしくは段階 (step)、または要素、完全体もしくは段階の群を包含することを意味するが、その他の要素、完全体もしくは段階、または要素、完全体もしくは段階の群を排除することを意味するものではないと理解されるであろう。

【0038】

本発明がさらに明白に理解されうるように、以下の図面を参照して好ましい形態を説明する。

【0039】

本発明の実施様式

材料および方法

試薬

全ての化学品は、特に断りのない限り、Sigma社 (St Louis, MO) から得た。ホウ酸はICN社 (Costa Mesa, CA) から得た。メタノールはMerck社 (Kilsyth, Vic) から得た。

【0040】

Trisホウ酸 (TB) 泳動バッファー:

tris base 6.5g、ホウ酸 1.275g、脱イオンH<sub>2</sub>Oで1 Lに希釈、pH 9.0。

【0041】

Trisホウ酸 (TB)泳動バッファー：

tris base 7.74g、ホウ酸 11.87g、脱イオンH<sub>2</sub>Oで1 Lに希釈、pH 8.0。

【0042】

GABA-酢酸泳動バッファー：

GABA 3.165g、酢酸 1.08mL、脱イオンH<sub>2</sub>Oで1 Lに希釈、pH 4.6。

【0043】

Gradiporeグリシンサンプルバッファー：

SDS 10% (w/v)、グリセロール 2.0mL、プロモフェノールブルー 0.1% (w/v)、tris-HCl (pH 6.8) 0.5M、脱イオンH<sub>2</sub>Oで10mLに希釈。

【0044】

ジチオトレイトール (DTT)：

メタノール1mL当たりDTT 3mg。

【0045】

SDSグリシン泳動バッファー：

tris base 2.9g、グリシン 14.4g、SDS 1g、脱イオンH<sub>2</sub>Oで1 Lに希釈、pH 8.3。

【0046】

Towbinバッファー：

tris 25mM、グリシン 192mM、メタノール 20%、脱イオンH<sub>2</sub>Oに希釈、pH 8.3。

【0047】

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)：

NaCl 9g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.9g、KCl 2g、脱イオンH<sub>2</sub>Oで1 Lに希釈、pH 7.2。

【0048】

4-クロロ-1-ナフトール (4CN)：

メタノール1mL当たり4CN 3mg。

## 【0049】

Gradipure(商標) :

クーマシーブリリアントブルー<1% w/v、硫酸アンモニウム 約10% w/v、オル  
トリン酸 約1% v/v、メタノール 約20% v/v。

## 【0050】

アルブミン単離

ブールした正常血漿の1部をTrisホウ酸 (TB)泳動バッファー、pH 9.0を用いて  
3部に希釈し、Gradiflow(商標)装置の上流に入れた。アルブミンを、1工程プロ  
セスにおいて、その等電点より高いpHにおけるアルブミン電荷およびその分子量  
を利用して、血小板を含まない血漿から単離した。75 kDaカットオフ分離膜を有  
する分離カートリッジを、2つの50 kDaカットオフ制限膜の間に配置した。分離  
ユニットを横切って250ボルトをかけて、分離膜を通してのアルブミンの移動に  
よってアルブミンをより高い分子量混在物から除去する一方、より小さい分子量  
の混在物を50 kDaカットオフ制限膜を通して消散させた。アルブミンを30分間隔  
で、全体で180分間、回収した。

## 【0051】

調製物の純度は、SDS PAGE (Gradipore Tris-グリシン 8~16%勾配ゲル) お  
よびサイズ排除HPLCを使って決定した。

## 【0052】

プロモクレゾールグリーンキット (BCG) はTrace Scientific社 (Clayton, Me  
lbourne, Australia) により入手し、これを単離過程全体を通して使い、アルブ  
ミン濃度を定量した (Dumas BT, Watson WA, Briggs HG. 「アルブミン標準お  
よびプロモクレゾールグリーンを用いる血清アルブミンの測定」 (Albumin stand  
ards and the measurement of serum albumin with bromocresol green), Clin  
. Chimm. Acta, 31 (1971) p.87)。分析は製造者の指示書に従って行った。

## 【0053】

免疫グロブリン (IgG) 単離

さらに、アルブミン単離から得た上流残留物を、200 kDaカットオフ分離カー  
トリッジとTB泳動バッファー、pH 9.0とを用いて処理した。250ボルトの電位を



分離ユニットを横切って1時間適用した。この膜のサイズとpH 9におけるIgGの低い電荷対質量比との組み合わせは、IgG移動を制限すると同時により小さい分子量の混在物が膜を通過することを可能にし、IgGおよびより高い分子量の混在物を上流に残す。第2の精製工程は、pH 4.6で500 kDaカットオフ分離膜を使って2時間かけて行った。250ボルトの逆の極性の電位を適用すると、IgGは、他の高分子量の混在物を上流に残して分離膜を通して移動した。

#### 【0054】

ウェスタンブロット分析を、Towbinら (1979) (Towbin H, Staehelin T および Gordon J., 「タンパク質のポリアクリルアミドゲルからニトロセルロースシートへの電気泳動移行：方法と複数の応用」 (Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications). Proc Natl Acad Sci USA 1979, 76:4350) が記載したように、選択したSDSゲル上で行った。ブロッティング濾紙およびニトロセルロースブロッティング膜を、Towbinバッファーに60分間、前浸漬した。タンパク質移行は半乾燥ブロッティング装置 (Macquarie University, Sydney, Australia) を用いて12Vで90分間行った。膜を、PBSを用いて5分間洗浄し、スキムミルク1%を含むPBSを用いて10分間ブロックした。膜を、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を結合したウサギ抗ヒトIgA、IgG、IgM、 $\kappa$ 鎖、 $\lambda$ 鎖の20  $\mu$ Lを含む1%スキムミルク10ml溶液を用いて60分間染色した。5部のPBSで1部を希釈して容積10mlとした4CN、およびH<sub>2</sub>O 10  $\mu$ Lを用いて染色を現像した。ブロットの現像は30分間以内に起った。

#### 【0055】

##### $\alpha_1$ アンチトリプシン単離

アルブミン精製の下流生成物を、さらに、50 kDaカットオフ分離膜を使うとともにTB泳動バッファー、pH 8.0を用いて処理した。250ボルトの電位を分離ユニットに3時間印加した。 $\alpha_1$  アンチトリプシンは下流に移動し、これを毎時間回収した。さらに精製されたアルブミンは上流に残った。SDS PAGEを使ってサンプルの純度を分析した。

#### 【0056】

ウェスタンブロット分析を、Towbinら (1979) (Towbin H, Staehelin TおよびGordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979, 76:4350) が記載したように、選択したSDSゲル上で実施した。ブロッティング濾紙およびニトロセルロースブロッティング膜は、Towbinバッファー中に60分間、予備浸漬した。タンパク質移動は半乾燥ブロッティング装置 (Biorad) を用いて15Vで60分間実施した。膜をPBSを用いて5分間洗浄し、スキムミルク1%を含むPBS/0.1% Tween 20(v/v)を用いて10分間ブロックした。膜を、モノクローナル抗ヒト $\alpha_1$ アンチトリプシン (Biodesign、クローン番号1102) 10 $\mu$ Lを含む1%スキムミルク溶液10mLと共に60分間インキュベートした。次いで膜を、DAKOウサギ抗マウスHRPコンジュゲートを含む1%スキムミルク溶液を用いて60分間標識した。膜を、4CNの1部をPBSの5部に希釈して容積10mLとした溶液およびHL0: 10 $\mu$ Lを用いて呈色した。プロットの呈色は30分間以内に起った。

#### 【0057】

$\alpha_1$ アンチトリプシン回収率を、比濁分析計、Behring Nephelometer 100 Analyzer (Dade Behring, Marburg, Germany) を使って測定した。アッセイはウサギ抗ヒト $\alpha_1$ アンチトリプシン比濁計試薬 (Dade Behring OSAZ 15) を使って製造者の指示書に従って実施した。

#### 【0058】

$\alpha_1$ アンチトリプシンの機能性は、色素形成エラスターゼ中和アッセイを利用して研究した。エラスターゼは、pH 8.0バッファーを用いて、1:1、1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320に希釈した (註、Sigmaから得たエラスターゼストック溶液は32 U/mlであった)。それぞれのエラスターゼ希釈液50 $\mu$ Lを $\alpha_1$ アンチトリプシンサンプル50 $\mu$ Lに加え、15分間振とうした。各エラスターゼ希釈液を等量の泳動バッファーと組み合わせた、サンプルの対照セットも調製した。それぞれの混合物20 $\mu$ Lをピペットで採取して平底マイクロタイタープレート of ウェルに入れ、pH 8.0のバッファーを用いて新しく1:100に希釈したPefa-ELA 基質 (Pentapharm, Basel, Switzerland) 150 $\mu$ Lを加えた (註、各バイアルは、DMSO 1mlを用いて再構成しかつ+4℃で保存した)。発色は、37℃にてプレートリ

ーダー (Versamax, Molecular Devices) 中で2時間にわたり405nmの波長でモニターした。各ウェルに対して20点を超えるVmaxを計算することによって速度論的分析を行った。エラスターゼ濃度に対するVmaxのプロットをlog-logスケールで作った。プロットの直線部分をx軸方向に外挿して、エラスターゼ中和ユニットで表したアンチトリプシン濃度を求めた。

#### 【0059】

アルブミンの混在を、Trace Scientific社 (Clayton, Melbourne, Australia) (Doumas BT, Watson WA, Briggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin. Chim. Acta, 31 (1971) p. 87) より供給されたブロモクレゾールグリーンキット (BCG) を使って研究した。分析は製造者の指示書に従って実施した。

#### 【0060】

抗トロンビンIIIの混在を、ELISAアッセイを使って研究した。ヘパリン(1.5mg/mL)100 $\mu$ Lを平底マイクロタイタープレートに一晚かけて結合させた。プレートを、PBS/Tween 20(0.1% v/v)250 $\mu$ Lで3回洗浄し、その後、抗トロンビンIII基準 (Sigma, St Louis, MO) 50 $\mu$ L、上流サンプル50 $\mu$ Lおよび下流サンプル50 $\mu$ L (1:10 PBS/Tween 20) をアブライした。プレートを室温にて1時間インキュベートし、再び、PBS/Tween 20で洗浄した。DAKOウサギ抗ヒト抗トロンビンIII (1:1000 PBS/Tween 20) 50 $\mu$ Lをアブライし、プレートをさらに1時間インキュベートした。次いでプレートを洗浄し、DAKOヤギ抗ウサギHRPコンジュゲート50 $\mu$ Lをアブライした。プレートを洗浄し、o-トルイジン100 $\mu$ Lを使って呈色し、次いでプレートを1時間インキュベートした。呈色を、3M HCl 50 $\mu$ Lを使って停止した。プレートを450nmで読取り、サンプルを作成した基準曲線と比較した。

#### 【0061】

SDS PAGE (Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 (バクテリオファージT4のヘッド構築過程の構造タンパク質の切断) . Nature 1970; 227:680-685) を、Tris-グリシン-SDS泳動バッファーを使って実施した。SDS PAGEサンプルは、Gradiporeグリシンサンプルバッファー40 $\mu$ L、DTT 10 $\mu$ Lおよびサンプル50 $\mu$ Lを使って調製し、5分間

煮沸した。SDS PAGEを150ボルトで90分間実施した。

#### 【0062】

全てのSDS PAGEゲルをGradipure (商標) (Gradipore, Sydney, Australia) を用いて染色した。

#### 【0063】

HPLCは、ZORBAX GF 250の4.6x250mm 分析カラムと組み合わせた島津SCL-10A VP HPLCシステムを使って実施した。サンプルは、pH 7にて200 mM NaClを含有する100 mMリン酸バッファーで泳動させた。

#### 【0064】

### 結果

#### アルブミン単離

1ステップ精製手法は、95%より高い純度のアルブミンを回収率72%で得ることに成功した。図1のSDS PAGEは、精製手法を例示する。アルブミンは血漿（レーン2）から、75 kDa分離膜を通して下流へ移動する（レーン5～10）ことによって単離された。より小さい分子量の混在物は、50 kDa制限膜を通過して消失した。アルブミンを30分間隔で、全体で180分間回収した。残留血漿タンパク質は上流（レーン3）に保持され、これは後で行うIgG精製に使用した。単一ピーク純度をもつアルブミンが血漿から単離されたので、市販の治療用製品と比較した（図2）。Gradiflow (商標) 技術を用いて調製したアルブミンを市販の治療用調製物と比較した。HPLCは、ZORBAX GF 250の4.6x250mm分析カラムと組み合わせた島津SCL-10A VP HPLCシステムを使って実施した。サンプルは、pH 7にて200 mM NaClを含有する100 mMリン酸バッファーで泳動させた。全体の精製工程は時間で3時間を要しただけであり、本方法の迅速性を例証するものである。α<sub>1</sub>アンチトリプシンの単離におけるアルブミン調製物の処理は、さらにGradiflowアルブミン製品の純度を高めた。

#### 【0065】

#### 免疫グロブリン (IgG) 単離

アルブミン分離から得た残留上流の処理は、プロセス全体を通して重要な血漿成分の廃棄物を削減した。さらに、第1精製工程のアルブミンの除去によって、I

gG単離の泳動時間は短縮した。図3および図4は還元SDS PAGEおよび対応するウェスタンブロット分析を示し、特徴的なIgGの重鎖および軽鎖の存在を例示する。アルブミン単離から得た残留血漿タンパク質（レーン3）をさらに2工程プロセスで分画したが、その第1工程で200 kDaより小さい分子量の混在物を除去する。第2工程はIgG成分を上流から下流へ移動させて濃縮した（レーン3～6）。精製の工程2から得た生成物をウェスタンブロットにかけ、DAKO抗免疫グロブリン抗体と共にインキュベートした。染色したバンドは、血漿から複数の免疫グロブリンファミリーが単離されたことを示している（図4）。免疫グロブリン生成物の純度は、PAGE電気泳動（phoretix）を使って95～100%と決定した（図5）。Gradiflow（商標）で精製したIgG調製物を市販治療用調製物と比較すると、類似の純度と特性を示した。

#### 【0066】

本生成物のさらなる処理により、特定の免疫グロブリンファミリーを本プロセスで単離し、特定のグループの純度を高め得る。免疫グロブリン収率は、HPLCを使って定量して計算した結果、75%より高かった。

#### 【0067】

##### $\alpha_1$ アンチトリプシン単離

$\alpha_1$  アンチトリプシンを、Gradiflow（商標）で精製したアルブミン調製物から、73%の回収率で精製した。図6は、本発明を用いて取得可能な $\alpha_1$  アンチトリプシンの純度を例示し、生物学的活性の保持とともに、Gradiflow（商標）技術を用いる機能的タンパク質を精製する能力を実証する。 $\alpha_1$  アンチトリプシンを、Gradiflow（商標）で精製したアルブミン（レーン2）から、50 kDa分離膜を通した下流への移動（レーン7～9）によって単離した。 $\alpha_1$  アンチトリプシンを60分間隔で、全体で180分間回収した。残留アルブミンは上流に保持された（レーン3～5）。アルブミン調製物からの $\alpha_1$  アンチトリプシンの除去は、より高い純度のアルブミンをもたらし、また $\alpha_1$  アンチトリプシン単離の時間も短縮した。Gradiflow（商標）画分の処理で得られる他の利点は、重要な血漿タンパク質の廃棄物の削減であった。 $\alpha_1$  アンチトリプシン活性の保持は、エラスターゼ活性を阻害する能力によって実証された。アルブミン調製物に検出し得る活性は残らなかった。

た。

### 【0068】

図7は、8-16%非還元SDS PAGEのウェスタンブロット分析を示す。 $\alpha_1$ アンチトリプシンを、Gradiflow (商標) で精製したアルブミン (レーン1) から、50 kDa 分離膜を通しが下流への移動 (レーン6~8) によって単離した。図8は、 $\alpha_1$ アンチトリプシン機能分析を示すが、 $\alpha_1$ アンチトリプシン生物学的活性は色素形成エラスターゼ阻害アッセイを用いて研究した。Gradiflow (商標) で精製した $\alpha_1$ アンチトリプシン画分は、残留アルブミン生成物とは対照的に活性を示した。

### 【0069】

活性を有する $\alpha_1$ アンチトリプシン生成物のアルブミンの混在は、高くても0.061mg/mLであることが示された。通常の単離手法を用いる過剰なアルブミン混在除去ステップの必要性は極く小さい。 $\alpha_1$ アンチトリプシン調製物からの抗トロピンIIIの非存在は、Gradiflow技術の格段に優れた分離能力を例証する。

### 【0070】

#### 同時分離

血漿タンパク質分離のための現行法は、Cohn分画法の利用を含むものであり、タンパク質をそれらの精製された形態に分離するのに3~5日かかり得る。Gradiflow (商標) 技術を利用すると、分離時間を実質的に3日から3時間にまで短縮することが可能である。複数のGradiflow (商標) 機器を連結することによって、血漿から複数のタンパク質を単一バンド純度に、個々のタンパク質をそれぞれ分離するのに要するのと同じ3時間で、同時分離することが可能である。複数のGradiflow (商標) 装置を一緒に直列に連結することによって、血漿を異なる精製タンパク質の複数の異なる画分に分離して、別々の流で回収することができる。Gradiflow (商標) は線形のスケーラビリティ (linear scalability) を有するので、1台の機器しか使えない場合には1タンパク質当たり最小で2~3時間かかるのが、複数タンパク質を1回の3時間で分離することが可能になる。

### 【0071】

適当に希釈した血漿を第1装置の第1流に入れ、200 kDa分離膜を通過させて分離する。このステップで選択した分離膜は2つの機能をもつ。この膜の孔サイズ

は、全てのアルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンを下流に通過させ、下流で2つのタンパク質をさらに精製することができる。さらにこの膜は、200 kDaより小さい分子量を有する全てのタンパク質混在物を、第1流に保持される免疫グロブリンおよび他の高分子量成分から除去することを可能にする。

#### 【0072】

80 kDa分離膜を備える第2のGradiflow (商標) 装置を使って、第1装置からの下流を処理する。この膜はアルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンだけを第3の下流中に通過させるが、より大きな混在物は全て第2流中に保持する。40 kDa分離膜を備える第3の装置を第2装置に接続して、アルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンを含有する第3下流を処理する。この膜を選択することによって、第3流からのアルブミンの移動を防止するが、 $\alpha_1$ アンチトリプシンを通過させて第4流で回収する。この分離後、実質的に純粋なアルブミンが第3流に残り、実質的に純粋な $\alpha_1$ アンチトリプシンが第4流に回収される。

#### 【0073】

アルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンをそれらの分離流、順に第3流および第4流中に分離すると、次いでIgGを処理済み第1流から分離することができる。これは、第1装置を第2および第3装置から取り外してバッファのpHを変えることにより行う。pH 4.6のGABA/酢酸バッファが適当であり、その電位は、通常のIgG分離第2工程のプロトコルと同じく、逆転させる。

#### 【0074】

3種のタンパク質、アルブミン、 $\alpha_1$ アンチトリプシンおよびIgGの全てを、この組合わせの装置を使うことによって、単一バンド純度まで80%以上の収率で分離することができる。アルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンは両方とも精製するのに約3時間かかるが、IgGは、アルブミンおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンを分離してしまった後に3つの装置を分離する必要があるので、さらに数時間長くかかる。

#### 【0075】

### 結論

単一容積の血漿からアルブミン、IgGおよび $\alpha_1$ アンチトリプシンを高速で精製

する方法を確立した。廃棄物の最少化ならびにエタノール沈殿および限外濾過などの様々な処理ステップの排除は、血液タンパク質の大規模精製におけるGradiflow (商標) 技術の可能性を実証する。本プロセスを最適化すれば、免疫グロブリンの特定のファミリーおよび種を取り出すことすら可能になり得る。さらなるGradiflow (商標) 廃棄物画分の処理によって、多くの他の重要な血漿分子を取り出すことができ、生物医薬供給源としての血漿の可能性を最大限にする方法が提供される。Gradiflow (商標) 技術の高い特異性により、特定の分子をターゲティングして、適当な方法を応用することにより取り出すことが可能になるであろう。

#### 【0076】

当業者であれば、特定の実施形態に示された本発明に対して、概括的に記載された本発明の精神または範囲から逸脱することなく、様々な修正および／または改変がなされ得ることを理解するであろう。従って、本発明の実施形態は、全ての点で、例示であって制限するものでないと考えられなければならない。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1: 8~16%非還元ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS PAGE) ゲル。アルブミンを、血漿(レーン2) から75 kDa分離膜を通して下流への移動によって単離した(レーン5~10)。小さい分子量の混在物は50 kDa制限膜を通過して消散した。アルブミンは30分間隔で、全体で180分間、回収した。残留血漿タンパク質は上流(レーン3)に保持され、次いでIgG精製を行った。

##### 【図2】

図2: サイズ排除高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)。Gradiflow(商標)技術を利用して調製したアルブミンを市販の治療用調整物と比較した。HPLCは、ZORBAX GF 250の4.6×250mm 分析カラムと組み合わせた島津SCL-10A VP HPLCシステムを使って行った。サンプルは、pH 7にて200 mM NaClを含有する100 mMリン酸バッファーで流した。

##### 【図3】



図3；4～20%還元SDS PAGEゲル。アルブミン単離から得た残留血漿タンパク質（レーン3）を、さらに2工程プロセスで分画し、その第1の工程で200 kDaより小さい混在物を除いた。その第2の工程で、IgG成分を上流から下流へ移行させてIgG成分を濃縮した（レーン3～6）。

#### 【図4】

図4；4～20%還元SDS PAGEゲルのウェスタンブロット分析。精製の工程2から得た生成物をウェスタンブロットにかけ、DAKO抗免疫グロブリン抗体と共にインキュベートした。染色したバンドは複数の免疫グロブリンファミリーが血漿から単離されたことを示す。さらにサンプルを処理すると個々のファミリーを精製することができるであろう。

#### 【図5】

図5；非還元SDS PAGE泳動(phoretix)。Gradiflow(商標)で精製したIgG調製物を市販の治療調製物と比較した。

#### 【図6】

図6；8～16%非還元SDS PAGE。 $\alpha_1$ アンチトリプシンを、Gradiflow(商標)で精製したアルブミン（レーン2）から、50 kDa分離膜を通して下流への移動によって単離した（レーン7～9）。 $\alpha_1$ アンチトリプシンを60分間隔で、全体で180分間、回収した。残留アルブミンは上流に保持された（レーン3～5）。

#### 【図7】

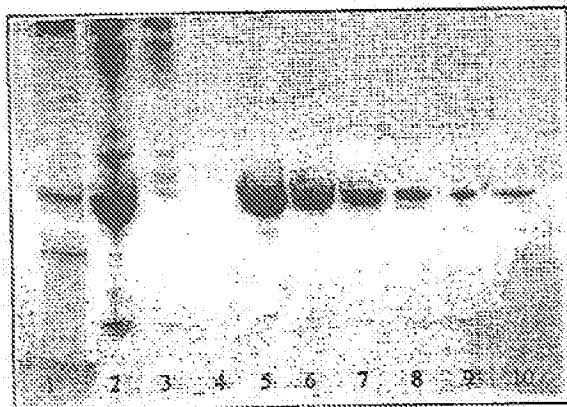
図7；8～16%非還元SDS PAGEのウェスタンブロット。 $\alpha_1$ アンチトリプシンを、Gradiflow(商標)で精製したアルブミン（レーン1）から、50 kDa分離膜を通して下流への移動によって単離した（レーン6～8）。

#### 【図8】

図8； $\alpha_1$ アンチトリプシン機能分析。 $\alpha_1$ アンチトリプシン生物学的活性を色素形成エラスターゼ阻害アッセイを用いて研究した。残留アルブミン生成物とは対照的に、Gradiflow(商標) $\alpha_1$ アンチトリプシン画分は活性を示した。

【図1】

## アルブミン単離のSDS PAGE分析



1: 分子量マーカー

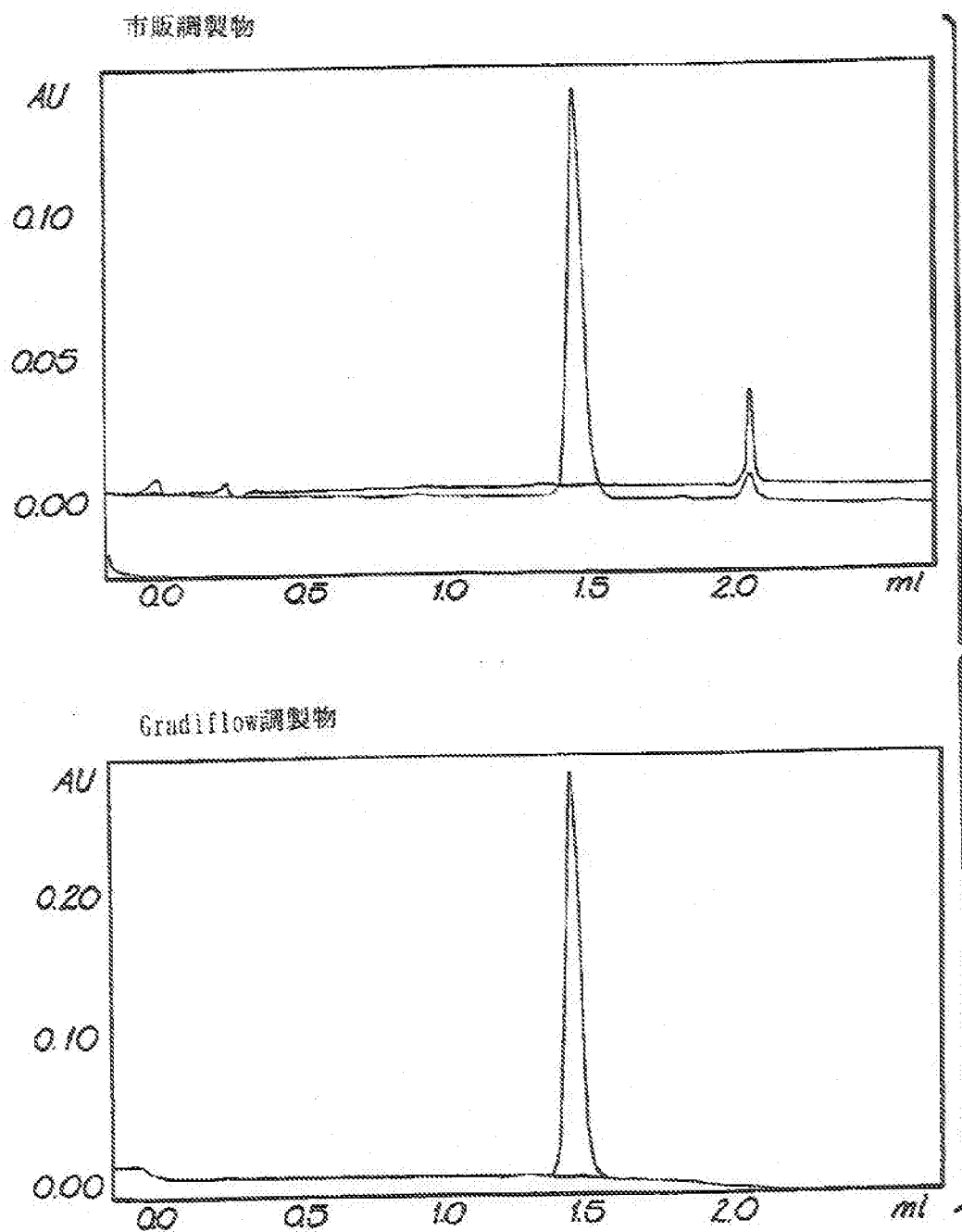
2: 血漿

3: 上清残留物

4: 下流, 時間ゼロ

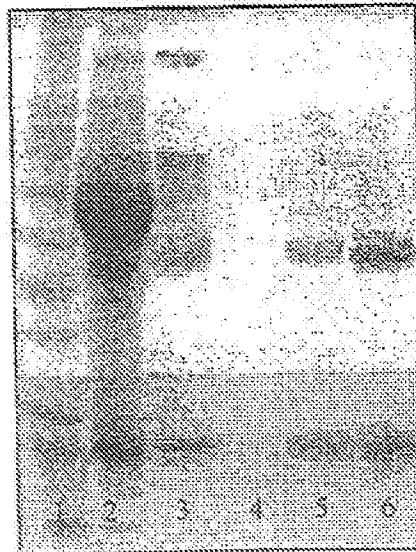
5~10: 下流アルブミン生成物

【図2】



【図3】

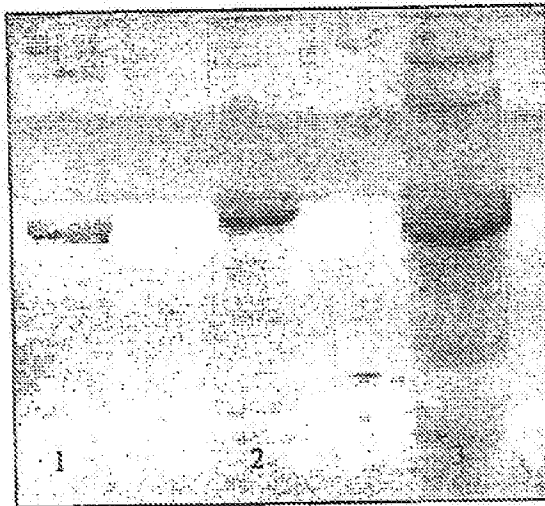
## IgG単離の還元SDS PAGE分析



- 1: マーカー
- 2: 血漿
- 3: 上流工程I
- 4: IgG生成物-30分
- 5: IgG生成物-60分
- 6: IgG生成物-90分

【図4】

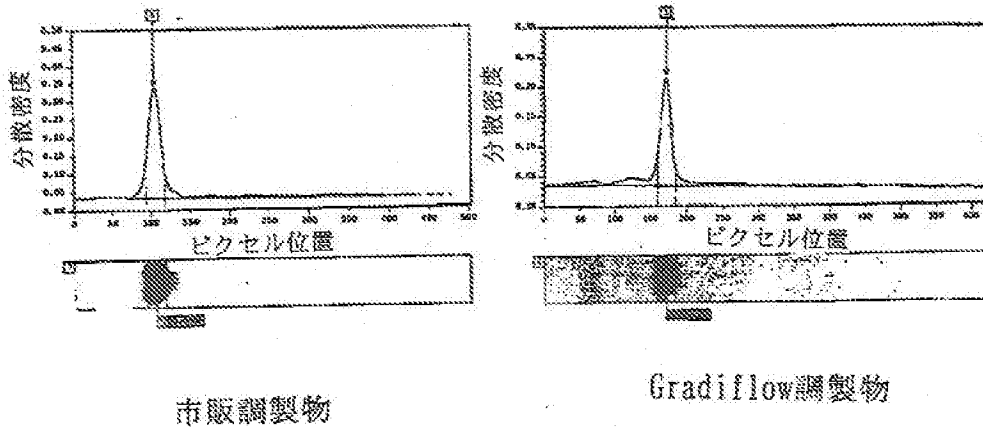
## IgG単離のウェスタンブロット分析



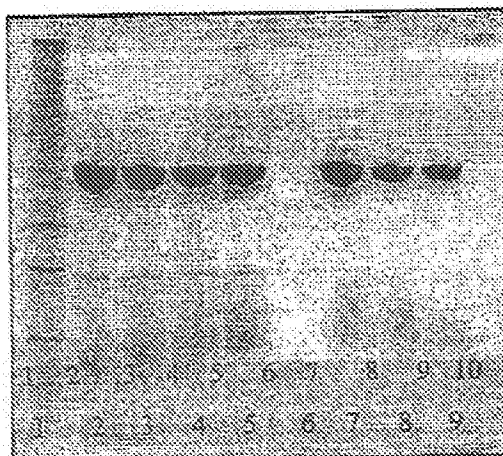
- 1: 血漿
- 2: Gradiflow IgG生成物
- 3: 市販IgG調製物

【図5】

## IgG単離の非還元SDS PAGE電気泳動 (phoretix)



【図6】

 $\alpha_1$ アンチトリプシン単離の非還元SDS PAGE

レーン1: 分子量マーカー

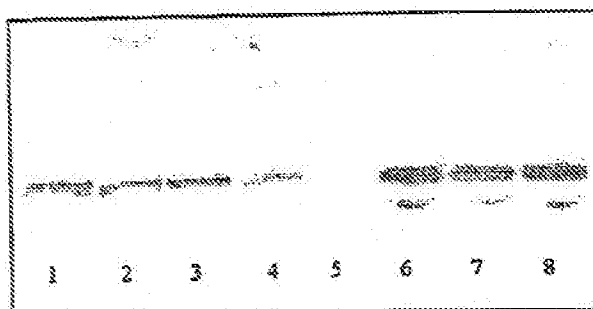
レーン2: Gradiflowアルブミン生成物

レーン3-5: 上流、1、2および3時間

レーン6: 泳動バッファー

レーン7-9:  $\alpha_1$ アンチトリプシン生成物

【図7】

 $\alpha_1$ アンチトリプシン単離の非還元SDS PAGEのウェスタンブロット分析

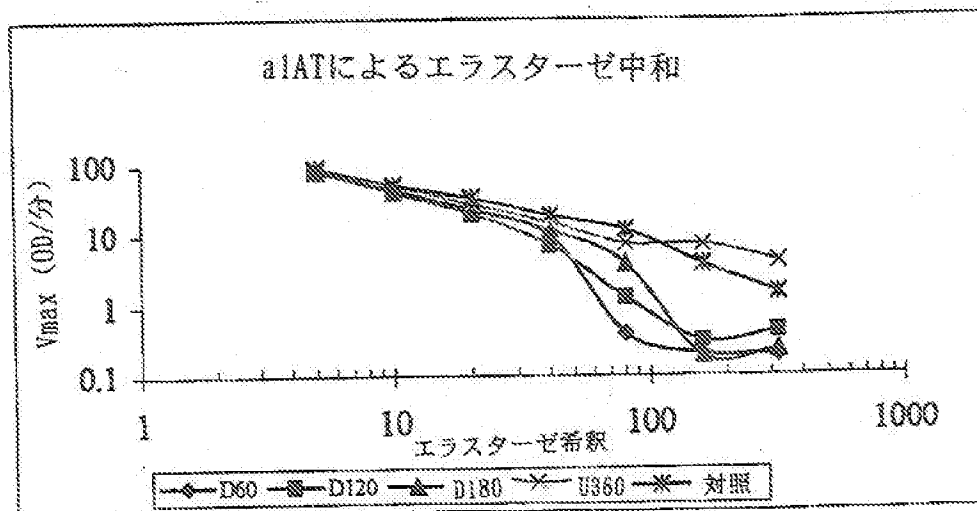
1: 血漿

2-4: 上流、1、2および3時間

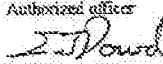
5: 下流、ゼロ時間

6-8:  $\alpha_1$ アンチトリプシン生成物

【図8】

Gradiflowで単離した $\alpha_1$ アンチトリプシンの機能分析

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU00/00368
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int. Cl. <sup>71</sup> C07K 1/26, C07K 14/47, C07K 14/76, C07K 16/06, C07K 16/34, B01D 71/74		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN: File WPID, File medline, File biosis, File HCA; Keywords: electrophor, plasma, albumin, anti-trypsin, antibod, immunoglob, membran.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, A, 3,989,613 (Gritzner) 2 November 1976 See whole document, in particular column 1 line 39 to column 2 line 8.	1-33
A	EP, A2, 052 391 (Centre National de la Recherche Scientifique) 26 May 1982 See whole document	1-33
A	Journal of Chromatography A 827 (1998) 329-335. "Purification of monoclonal antibodies from ascitic fluid using preparative electrophoresis." See whole document.	1-33
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 15 June 2000		Date of mailing of the international search report 06 JUL 2000
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au Facsimile No: (02) 6285 3829		Authorized officer  IAN DOWD Telephone No: (02) 6283 2273

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU00/00308
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Electrophoresis 1994, 15, 968-971, "Multifunctional apparatus for electrokinetic processing of proteins". See whole document.	1-33
A	Derwent Abstract Accession No. 85-041569/07, Class B04, JP 60-001134 A (FUJI REBIO KK) 7 January 1985	1-33
A	Derwent Abstract Accession No. 87-253908/36, Class S03, JP 62-175498 A (NITTO ELECTRIC IND KK) 1 August 1987	1-33
A	International Workshop of the University of Munich and the International Society for Artificial Organs, Rottach-Egern (FRG), March 17-19, 1983. "Plasma Separation and Plasma Fractionation. Current Status and Future Directions" Editors: M.J. Lysaght and H.J. Gurland, Munich	1-33



INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/A1/00/00308
<b>Box I</b> Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos. :	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos. : 28-29	because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: No meaningful scope could be placed upon the term "Gradiflow technology" and no meaningful method steps could be elucidated.
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos. :	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(c).
<b>Box II</b> Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos. :	
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims, as is covered by claims Nos. :	
Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family membersInternational application No.  
PCT/AU00/00308

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
US	3989613	US	4043895		
EP	52391	AR	224972	AT	8465
		AU	543271	BR	8107239
		DE	3164907	ES	507393
		IE	52276	MX	153338
		US	4437967	ZA	8107701
				AU	77194/81
				CA	1161789
				FR	2493725
				NZ	198902

END OF ANNEX

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	識別記号	F I	キーワード (参考)
C07K 14/47		C07K 14/47	
14/76		14/76	
16/18		16/18	
C12N 9/99		C12N 9/99	
(81) 指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW ), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, C N, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, K P, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, S G, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72) 発明者	ナイル、チェニチェリ、ハリハラン		
	オーストラリア国 2154 ニューサウスウ		
	ェールズ、キャッスル ヒル、コンバラ		
	アベニュー 1		
Fターム(参考)	4C087 AA01 AA04 AA05 BB34 BB35		
	CA13 CA16 DA04 DA14 DA26		
	NA20 ZA51 ZA52		
	4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA42		
	DA55 DA75 EA34 FA71 GA30		